

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 445**

51 Int. Cl.:
C12N 15/50 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03738299 .1**
96 Fecha de presentación: **01.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1525313**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **PROTEÍNA SPIKE DE CORONAVIRUS RESPIRATORIO CANINO (CRCV), POLIMERASA Y HEMAGLUTININA / ESTERASA.**

30 Prioridad:
27.07.2002 GB 0217434

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2012

73 Titular/es:
**THE ROYAL VETERINARY COLLEGE
UNIVERSITY OF LONDON, ROYAL COLLEGE
STREET
LONDON NW1 0TU, GB**

72 Inventor/es:
**BROWNIE, John;
CHALKER, Victoria Jane y
ERLES, Kerstin**

74 Agente/Representante:
Urizar Anasagasti, José Antonio

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 384 445 T3

Descripción

[0001] La presente invención se refiere a materia biológica, y en particular a un coronavirus respiratorio canino que esta presente en perros teniendo enfermedad respiratoria infecciosa.

[0002] La enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) es una enfermedad altamente contagiosa común en perros alojados en condiciones congestionadas tales como sitios de acogida y perreras de internado o entrenamiento. Muchos perros padecen únicamente una tos leve y se recuperan después de poco tiempo, sin embargo en algunos casos puede desarrollarse una bronconeumonía severa (Appel and Binn, 1987).

[0003] La patogénesis de ERIC esta considerada ser multifactorial, suponiendo varios virus y bacterias. Los agentes infecciosos considerados como los mayores patógenos causantes de ERIC son parainfluenzavirus caninos (PIVC) (Binn *et al.*, 1967), adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) (Ditchfield *et al.*, 1962) y la bacteria *Bordetella bronchiseptica* (Bemis *et al.*, 1977, Keil *et al.*, 1998). También, virus de herpes canino, virus reo humano y especies de micoplasma han sido aisladas de perros con síntomas de ERIC (Karpas *et al.*, 1968, Lou and Wenner 1963, Randolph *et al.*, 1993) Factores adicionales como el estrés pueden ser importantes.

[0004] ERIC es raramente mortal pero retrasa la acogida de perros en sitios de rescate y causa trastorno de horarios en perreras de entrenamiento así como costes considerables de tratamiento.

[0005] Las vacunas están disponibles contra algunos de los agentes infecciosos asociados con la enfermedad, concretamente *Bordetella bronchiseptica* así como CPIV y CAV-2. Sin embargo, a pesar del uso de estas vacunas, ERIC es todavía prevalente en perreras por todo el mundo, lo cual es posiblemente debido a las vacunas que no proporcionan protección contra todos los agentes infecciosos involucrados en ERIC.

[0006] Hemos descubierto un coronavirus novedoso, que hemos llamado coronavirus respiratorio canino (CRCV), en una población grande de perros en perreras con un historial de enfermedad respiratoria endémica, y hemos mostrado que este virus está asociado con ERIC.

[0007] Se conoce que algunos miembros de la familia *coronaviridae* causan enfermedad respiratoria en humanos, ganado bovino, aves de corral y ganado porcino (Mäkelä *et al.*, 1998, Pensaert *et al.*, 1986, Ignjatovic and Sapats 2000). Por ejemplo, el coronavirus respiratorio bovino está asociado con la fiebre de embarque en ganado que es una enfermedad respiratoria multifactorial (Storz *et al.*, 2000).

[0008] Sin embargo, no se sospechaba que el coronavirus, tenía un papel en la patogénesis de ERIC. En efecto, con únicamente una excepción, los coronavirus han sido declarados ser virus entéricos y causar diarrea aguda principalmente en perros jóvenes (por ejemplo, Tennant *et al.*, 1993). En un gran estudio de virus involucrados en enfermedades respiratorias caninas, Binn *et al.* (1979) declaró la detección de un coronavirus canino en el pulmón de un solo perro que está también infectado de SV5 y adenovirus canino 2, otros dos virus que están asociados con enfermedad respiratoria canina.

[0009] Existen de 30-40 vacunas de perro comercialmente disponibles en el Reino Unido para usar contra un número de patógenos que pueden causar una gama de enfermedades, tales como enfermedades neurológicas, entéricas, hepáticas y respiratorias. La mayoría de las vacunas contienen agentes microbianos tales como el virus moquillo, el Adenovirus-2 Canino, parvovirus canino, virus parainfluenza canino y *Leptospira canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*. Ninguna de estas vacunas contiene coronavirus caninos.

[0010] Las vacunas de perro para uso contra enfermedades respiratorias caninas son comercializadas como vacunas "tos de perrera" (ver abajo). Todas las vacunas contienen *Bordetella bronchiseptica*, que es una bacteria asociada con "tos de perrera".

[0011] Coyne M.J. & May S.W., (1995) en su artículo titulado "Considerations in using a canine coronavirus vaccine" (publicado como un Boletín Técnico de Pfizer en Internet <http://www.pfizer.com/ah/vet/tref/trbull/ccv.html>), lista alrededor de 20 vacunas disponibles comercialmente contra bien coronavirus caninos solos o contra virus caninos juntos con otros organismos. Cada una de estas vacunas es para la enfermedad entérica canina, y no hay sugerencia de que un coronavirus canino puede estar asociado con la enfermedad respiratoria.

[0012] Las patentes Estadounidenses Nº 6,057,436 y 6,372,224, ambas a Miller *et al* y asignadas a Pfizer, Inc., describen el gen Spike del coronavirus canino entérico y usos para el mismo, incluyendo su uso como una vacuna contra la gastroenteritis. Ninguna de esas patentes sugiere que un coronavirus canino puede estar involucrado en ERIC.

[0013] Miembros de la familia de *coronaviridae* son virus envueltos, de 80-160nm de diámetro, conteniendo un genoma ARN lineal de cepa positiva. Las proteínas estructurales de coronavirus son la glucoproteína Spike (S), la glucoproteína de membrana (M) y la proteína nucleocápsida (N). La glucoproteína hemaglutinina/esterasa (HE) es hallada únicamente sobre la superficie de coronavirus de grupo II (por ejemplo coronavirus bovino y virus de hepatitis de ratón) (Spaan *et al*, 1988). Más detalles de la estructura de coronavirus pueden ser encontrados en el capítulo por Cavanagh *et al* titulado "Coronaviridae" p407-411, en "Virus Taxonomy, 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", pub. Springer-Verlag Wein, New York, Eds. Murphy *et al*, que es incorporado aquí por referencia.

[0014] El coronavirus respiratorio canino (CRCV) de la invención puede estar caracterizado por un coronavirus presente en los tractos respiratorios de perros con enfermedad respiratoria infecciosa. Para caracterizar más CRCV, hemos determinado la secuencia de 250 residuos nucleótidos de la polimerasa de CRCV (pol) ADNc (Figura 1) lo cual corresponde a una secuencia parcial aminoácida 83 de la proteína de pol. (Figura 2). Hemos clonado también y determinado la secuencia de los 4092 residuos nucleótidos Spike CRCV (S) ADNc (Figura 3), correspondiendo a 1363 aminoácidos (Figura 4). También hemos determinado la secuencia de 497 residuos nucleótidos del gen de CRCV hemaglutinina/esterasa (HE) (Figura 13), correspondientes a 165 aminoácidos (Figura 14). Hemos identificado que el CRCV tiene una homología sorprendentemente inferior al coronavirus canino entérico (CCV) mientras que tiene un nivel inesperadamente elevado de homología con el coronavirus bovino (cepa LY138 o Quebec) y coronavirus humano (cepa OC43).

[0015] Un cultivo de "CRCV Spike D-1", que es XL1-Blue *E. coli* (Stratagene) conteniendo un plásmido pT7Blue2 (Novagen) cuyo inserto contiene una porción del ADNc Spike de CRCV, ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en NCIMB Ltd bajo el número de Registro NCIMB 41146 el 25 de Julio de 2002. El depositante de NCIMB 41146 es el Royal Veterinary College, Royal College Street, London NW1 OTU, UK. La dirección de NCIMB Ltd es 23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, AB24 3RY, UK.

[0016] La relación filogenética del CRCV con once conocidos coronavirus fue determinada basada sobre una comparación de la secuencia de 250 nucleótidos del gen pol de CRCV y las regiones correspondientes de los otros virus (Figura 5). El coronavirus bovino (BCV), cepa OC43 del coronavirus humano (HCV) y virus de encefalomiелitis hemoglutinante (HEV) fueron hallados estar más cercanamente relacionados al CRCV, mientras que el CCV entérico fue hallado estar únicamente lejanamente relacionado con el CRCV.

[0017] Alrededor de los 250 residuos secuenciados del ADNc de pol, correspondientes a 83 aminoácidos, el CRCV únicamente tiene el 68.5% y el 75.9% de identidad secuencial en los niveles de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente, con la región equivalente del CCV entérico (cepa 1-71) gen pol (Genbank N° Registro. AF124986), como se muestra en las Figuras 6 y 7.

[0018] Alrededor de 4092 residuos nucleótidos secuenciados del gen de S CRCV, corresponden a 1363 aminoácidos, el CRCV tiene el 45% y el 21.2% de identidad de secuencia en el nucleótido (Figura 8) y niveles de aminoácido, respectivamente, con la región equivalente del gen de S de CCV entérico (cepa 1-71).

[0019] El CCV no es un coronavirus de grupo II y no posee un gen HE, de ahí que no es posible determinar la extensión de la identidad de la secuencia entre este gen en CRCV y en el CCV entérico.

[0020] Excepto como se describe abajo, la identidad de porcentaje entre dos secuencias nucleótidas o dos secuencias aminoácidas estaba determinada usando la version 34 de FASTA (Pearson WR. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA". Methods Enzymol.;183:63-98). Las características FASTA eran Penalización de apertura de Gap -16 y Penalización de extensión de Gap -4.

[0021] La identidad porcentual entre el CRCV y las secuencias Spike de CCV entéricas fue determinada usando la version 10 de GCG (Genetics Computer Group, (1991), Program Manual for the GCG Package, Version 7, April 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711). Los parámetros de GCG usados fueron: penalización de creación de Gap 50, penalización de extensión de Gap 3 para ADN, y Penalización de creación de Gap 8 y Penalización de extensión de Gap 2 para Proteína. Alineaciones de secuencia fueron realizadas usando ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

[0022] Para contrastar, sobre 350 residuos secuenciados del ADNc pol, CRCV tiene 98.8% de identidad de secuencia con la región equivalente del gen pol Quebec de la cepa de BCV (Genbank Accession No. AF220295), 98.4% de identidad de secuencia con el gen pol LY138 de la cepa BCV (Genbank Accession No. AF124985) y 98.4% de la identidad de la secuencia con el gen pol OC43 de HCV (Genbank Accession No. AF124989).

[0023] Existe únicamente una diferencia de aminoácidos entre la proteína pol. de CRCV sobre los 83 aminoácidos secuenciados y las proteínas pol. de BCV, HCV y HEV que es que el CRCV tiene E (Glu) al contrario que D (Asp) en la posición correspondiente a la posición 4975 en el genoma de BCV (Accession No. SWALL: Q91A29). Así la proteína pol de CRCV es 99% idéntica a las proteínas pol. de BCV, HCV y HEV por esta región.

[0024] Los códigos de aminoácidos de una y tres letras de la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission son usados aquí.

[0025] Sobre los 497 residuos nucleótidos secuenciados, correspondientes a 165 aminoácidos, del gen HE, el CRCV tiene 98.994% y 98.2% de identidad de secuencia con la región equivalente del gen HE LY138 de cepa de BCV (Genbank Accession No. AF058942) en los niveles aminoácidos y nucleótidos respectivamente. El CRCV tiene 98.189% (nucleótido) y el 98.2% (aminoácido) de identidad de secuencia con el gen HE coronavirus entérico humano (HECV) (Genbank Accession No. L07747); 97.4% (nucleótido) y 95.2% (aminoácido) identidad de secuencia con el gen HE OC43 de HCV (Genbank Accession No. M76373); y 92.0% (nucleótido) y 93.9% (aminoácido) identidad con HEV (Genbank Accession Nos. AF481863), como se muestra en las Figuras 15 y 16.

[0026] Como se muestra en las Figuras 16 y la Tabla 3, los tres aminoácidos que son diferentes entre la proteína HE de CRCV y cada una de las proteínas S de BCV, HECV, HCV y HEV, con 165 aminoácidos de la proteína HE de CRCV, son F (Phe) al contrario que L (Leu), N (Asn) al contrario que T (Thr), y L (Leu) al contrario que V (Val) en las posiciones correspondientes a las posiciones 235, 242 y 253, respectivamente, en los genes HE de BCV, HECV, HCV OC43 y HEV (Figura 16). Así F en posición 235, N en la posición 242 y L en la posición 253 podrían ser dicho aminoácidos específicos de proteína HE de CRCV.

[0027] Sobre 4092 residuos nucleótidos secuenciados, correspondientes a 1363 aminoácidos, del gen S de CRCV, el CRCV tiene 97.3% y 96% de identidad con la región equivalente de la cepa LY138 de BCV (Genbank Accession No. AF058942) en los niveles de nucleótidos y aminoácidos respectivamente. El CRCV tiene 96.9% (nucleótido) y 95.2% (aminoácido) de identidad con OC43 de cepa HCV (Genbank Accession No. Z32768), y el 83.8% (nucleótido) y el 80.4% (aminoácido) de identidad con HEV (Genbank Accession Nos. AF481863 (ADNc) y AAM 77000 (proteína)) como se muestra en las Figuras 9 y 10.

[0028] Los aminoácidos que son diferentes entre la proteína S de CRCV y cada una de las proteínas S de BCV, HCV y HEV, dentro de los 1363 aminoácidos de la proteína S de CRCV, están listados en la Tabla 1 abajo. Así los aminoácidos listados en la Tabla 1 podría ser decirse que son aminoácidos específicos de proteína S de CRCV. Los aminoácidos están enumerados desde el residuo inicial M al comienzo de la proteína CRCV, como se muestra en la Figura 4.

Tabla 1: Lista de 39 aminoácidos específicos a la proteína S de CRCV que no están presentes en las proteínas S de BCV, HCV y HEV.

Posición	Aminoácido	Posición	Aminoácido
103	V	692	G
118	V	695	S
166	D	757	W
171	M	758	G
179	K	763	Q
192	P	769	T
210	S	786	P

235	H		792	H
267	F		818	R
407	M		828	V
436	S		887	F
440	I		933	D
447	I		977	F
501	F		1011	T
525	Y		1018	S
528	N		1063	K
540	L		1256	L
582	K		1257	M
608	G			

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0029] La invención proporciona una composición de vacuna para vacunar perros. La composición comprende un coronavirus respiratorio canino (CRCV) lo cual comprende una proteína Spike (S) teniendo la secuencia aminoácida listada en la Figura 4, o una proteína S coronaviral teniendo al menos 97% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4, o un fragmento inmunogénico de la Fig. 4 de al menos 200 aminoácidos en extensión, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína S coronaviral o dicho fragmento inmunogénico de la Fig. 4. La proteína S coronaviral en la composición de vacuna puede tener al menos el 98% de identidad o al menos 99% de identidad con la secuencia aminoácida de la Fig. 4. La proteína S coronaviral en la composición de la vacuna puede ser una proteína aislada o recombinante. La composición de la vacuna puede también comprender un adyuvante aceptable farmacéuticamente.

[0030] La composición de la vacuna puede además comprender cualquiera o más de un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra el virus parainfluenza canino, un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra el adenovirus tipo 2 canino, un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra virus de herpes canino, y un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra *Bordetella bronchiseptica*.

[0031] La invención también proporciona una proteína S de coronavirus teniendo al menos 97% de identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4 para usar en medicina. La proteína S de coronavirus puede ser una proteína aislada o recombinante.

[0032] La invención además proporciona el uso de un coronavirus teniendo una proteína S con al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4 o una proteína S coronaviral teniendo al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína S coronaviral de la misma, en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmune contra coronavirus respiratorio canino en un perro o en la preparación de un medicamento para profilaxis de enfermedad respiratoria en un perro. El coronavirus puede comprender una proteína S teniendo al menos 95% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4 o puede comprender una proteína S teniendo la secuencia aminoácida de SEC ID N°:4. La proteína S coronaviral puede tener al menos 95% o al menos 97% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4. La proteína S coronaviral puede comprender al menos una de los aminoácidos específicos para la proteína S de CRCV en las posiciones listadas en la Tabla 1. La proteína S coronaviral puede comprender la secuencia aminoácida de la Fig. 4. La proteína S coronaviral en la composición de la vacuna puede ser una proteína aislada o recombinante.

[0033] La invención proporciona una composición de vacuna para vacunar perros comprendiendo un coronavirus respiratorio canino teniendo una proteína S con la secuencia aminoácida de la Figura 4, o una proteína S de coronavirus teniendo al menos 97% de identidad aminoácida de la proteína S de CRCV, o un fragmento inmunogénico de la Fig. 4 de al menos 200 aminoácidos en longitud, o ácido nucleico que codifica dicha proteína coronaviral o dicho fragmento inmunogénico de la Fig. 4.

[0034] Preferentemente, la vacuna es envasada y presentada para uso en perros.

[0035] Modificaciones de proteínas típicamente incluyen sustituciones de aminoácido para mejorar la antigenicidad de la vacuna. Las proteínas de BCV, HCV y HEV pueden ser modificadas para ser más como una proteína CRCV. Por ejemplo, la proteína Spike de BCV, HCV o HEV puede ser modificada para incluir un aminoácido CRCV en cualquiera de las diferencias mostradas en la comparación en la Figura 10, o listada en la Tabla 1.

[0036] Las proteínas en las cuales uno o más de los residuos de aminoácidos son químicamente modificados, pueden ser usadas siempre que la función de la proteína, concretamente la producción de los anticuerpos específicos *in vivo*, permanezca sustancialmente inalterada. Se aprecia que las proteínas sintetizadas pueden ser adecuadamente modificadas antes o después de su sintetizado. Tales modificaciones incluyen formar sales con ácidos o bases, especialmente ácidos orgánicos u inorgánicos fisiológicamente aceptables, formando un éster o amida de un grupo carboxilo terminal, y uniendo grupos protectores de aminoácido tales como N-t-butoxicarbonilo. Tales modificaciones pueden proteger el péptido de metabolismo *in vivo*.

[0037] La proteína puede estar presente como copias solas o múltiples, por ejemplo repeticiones en tandem. Tal tandem o repeticiones múltiples puede ser suficientemente antigénico en sí mismos para obviar el uso de un portador. Puede ser ventajoso para la proteína el ser formada como un bucle, con los extremos N-terminal y C-terminal unidos juntos, o al añadir uno o más residuos Cys a un extremo para incrementar antigenicidad y/o permitir puentes disulfuro a ser formados. Si la proteína es covalentemente vinculada a un portador, preferentemente un polipéptido, entonces el ajuste es preferiblemente tal que la proteína de la invención forma un bucle.

[0038] De acuerdo a teorías inmunológicas actuales, debería estar presente una función portadora en cualquiera de las formulaciones inmunogénicas con el fin de estimular, o mejorar la estimulación del, sistema inmune. Se piensa que los mejores portadores incorporan (o, junto con el antígeno, crean) un epitopo de célula T. Los péptidos pueden ser

asociados, por ejemplo por medio de reticulación, con un portador separado, tal como albúminas de suero, mioglobina, toxoides bacterianos y hemocianina de lapa californiana. Portadores más recientemente desarrollados que inducen ayuda de célula T en la respuesta inmune incluyen antígeno básico de hepatitis B (también llamado proteína nucleocápsida), supuestos epítomos de célula T tales como Thr-Ala-Ser-Gly-Val- Ala-Glu-Thr-Thr-Asn-Cys, betagalactosidasa y el péptido 163-171 de interleucina-1. El último compuesto puede ser considerado a veces como portador y a veces como adyuvante o como ambos. Alternativamente, varias copias de las mismas o diferentes proteínas de la invención pueden ser reticuladas entre sí; en esta situación no hay portador separado como tal, pero una función portadora puede estar proporcionada por tal reticulación. Agentes de reticulación adecuados incluyen aquellos listados como tales en los catálogos Sigma y Pierce, por ejemplo glutaraldehído, carbodiimida y succinimidil 4-(N-maleimidometil) carboxilato-1- ciclohexano, el último agente aprovechando el grupo SH en el residuo de cisteína C-terminal (si esta presente).

[0039] Si la proteína esta preparada por expresión de una secuencia nucleotídica adecuada en un huésped adecuado, entonces puede ser ventajoso expresarla como un producto de fusión con una secuencia péptida que actúa como un portador. El sistema "ECOSOC" de Kabigen es un ejemplo de tal disposición.

[0040] Se aprecia que el componente de coronavirus de la vacuna puede estar vinculado a otros antígenos para proporcionar un efecto dual.

[0041] La proteína S de coronavirus en la composición de la vacuna es una proteína S CRCV o de tipo CRCV como aquí se define, o un fragmento inmunogénico de la secuencia listada en la Figura 4, de al menos 200 aminoácidos en longitud.

[0042] La composición de vacuna contiene una proteína S CRCV que comprende o consiste en la secuencia aminoácida listada en la Figura 4, o una variante inmunogénica de la misma teniendo al menos 97% de identidad con la secuencia listada en la Figura 4. Preferentemente, la variante tiene al menos 98%, o al menos 99% de la secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4. Más preferentemente la variante tiene al menos 99.1 %, o al menos 99.2%, o al menos 99.3%, o al menos 99.4%, o al menos 99.5%, o al menos 99.6%, o al menos 99.7%, o al menos 99.8%, o al menos 99.9% de identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4.

[0043] En otra realización preferente, la composición de la vacuna comprende un CRCV.

[0044] En una realización preferente, el virus es un virus inactivo. Métodos para inactivar virus para uso en vacunas son bien conocidos en la técnica. Métodos adecuados incluyen métodos químicos, tales como betapropiolactona (BPL). Vacunas de coronavirus bovinos inactivos pueden incluir BCV inactiva que es un componente de vacunas bovinas tales como "Rotovet Corona" de Schering-Plough (<http://www.ukvet.co.uk/rotovec/scour.htm>); "Lactovac" por Hoechst Roussel Vet Ltd, (Veterinary Formulary 5th Edition del Veterinary Data Sheet Compendium); "First Defense" por Immuncell Corp, USA; "Scour Bos 4" por Grand Laboratoires y "Scour Guard 3K" por Pfizer.

[0045] En una realización alternativa, el virus es un virus atenuado. Los métodos para atenuar virus para uso en vacunas son bien conocidos en la técnica.

[0046] Preferentemente, la composición de vacuna también comprende un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0047] Preferentemente, cuando la vacuna comprende un ácido nucleico, el ácido nucleico codificando la proteína corona viral o o dicho fragmento inmunogénico para usar como una vacuna es un polinucleótido S de CRCV o de tipo CRCV. Más preferentemente, el ácido nucleico comprende o consiste de la secuencia nucleotídica listada en la Figura 3 o Figura 13, o fragmentos de la misma.

[0048] Para uso de vacuna, el ácido nucleico S de CRCV o de tipo CRCV puede ser proporcionado en varios vectores replicantes (por ejemplo vacuna de adenovirus recombinante) o no replicantes (vacuna de ADN).

[0049] En una realización preferente, la vacuna puede contener proteína S recombinante de CRCV o de tipo CRCV, así como también otras proteínas coronavirus inmunogénicas tales como la proteína HE.

[0050] Como se ha tratado arriba, se conoce que varios agentes virales y bacterianos son sabidos están asociados con enfermedad respiratoria en perros, incluyendo virus parainfluenza canino (CPIV), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), herpesvirus canino (CHV), y *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*).

[0051] En otra realización preferente, la vacuna puede contener proteína S recombinante de CRCV o de tipo CRCV, así como también otros organismos patógenos involucrados en enfermedad respiratoria de perros tal como parainfluenzavirus canino, adenovirus canino de tipo 2, la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, herpesvirus canino, reovirus humano y especies de micoplasma, o proteínas inmunogénicas de ellos. De este modo la vacuna puede contener un agente capaz de aumentar una respuesta inmune, tal como la producción de anticuerpos contra CRCV, así como contra otros organismos patógenos involucrados en enfermedad respiratoria de perros tal como CPIV, CAV-2, *B. bronchiseptica* y CHV.

[0052] En una realización, además de contener un agente capaz de estimular la producción de anticuerpos contra la proteína S CRCV, la composición de la vacuna además comprende uno o más cualesquiera de:

- (a) un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;
- (b) un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;
- (c) un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y
- (d) un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

[0053] De este modo la composición de la vacuna puede comprender opcionalmente cualesquiera dos, o tres o todos los cuatro de estos agentes adicionales (a), (b), (c) y (d).

[0054] Tipicamente, un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra CPIV comprende CPIV inactivo o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico codificando dicho fragmento inmunogénico.

[0055] Tipicamente, un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 comprende CAV-2 inactivo o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico codificando dicho fragmento inmunogénico.

[0056] Adenovirus canino de tipo 1 causa hepatitis infecciosa; adenovirus canino de tipo 2 causa enfermedad respiratoria. Se ha demostrado que CAV-1 proporciona protección cruzada contra CAV-2 y viceversa. El agente que

ES 2 384 445 T3

aumenta una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 puede por tanto contener bien CAV-1 o CAV-2, o un fragmento inmunogénico de los mismos. Las vacunas listadas abajo contienen CAV-2 excepto EURICAN DHPPi, que no especifica el tipo de virus usado.

[0057] Agentes adecuados que aumentan una respuesta inmune en un perro contra CPiV y CAV-2 son conocidos para una persona experta en la técnica. Por ejemplo, las siguientes vacunas de perro están permitidas en el Reino Unido.

[0058] KAVAK DA2PiP69 por Fort Dodge Animal Health es una vacuna liofilizada seca viva conteniendo cepas atenuadas de virus de moquillo, adenovirus canino de tipo 2, parainfluenza canina de tipo 2 y parvovirus canino criado en cultivo de tejido.

[0059] KAVAK Parainfluenza por Fort Dodge Animal Health contiene vacuna liofilizada viva de una cepa atenuada de virus parainfluenza canino de tipo 2 cultivado en una línea celular homóloga establecida.

[0060] NOBIVAC DHPPi por Intervet UK Limited es una vacuna de virus liofilizado atenuado conteniendo virus de moquillo, adenovirus canino de tipo 2, parvovirus canino y virus parainfluenza canino criado en cultivo de tejido de línea celular.

[0061] NOBIVACKCby IntervetUKLimited es una vacuna liofilizada viva conteniendo B-C2 de cepa *Bordetella bronchiseptica* y cepa Cornell de virus parainfluenza canino (esto es, una vacuna intranasal). Management authorisation number Vm 06376/4026.

[0062] EURICANDHPPi por Merial Animal Health Ltd. es una vacuna liofilizada viva contra moquillo, hepatitis canina infecciosa, parvovirus canino y virus parainfluenza canino de tipo 2.

[0063] VANGUARD 7 por Pfizer Ltd. contiene virus de moquillo atenuado vivo (Snyder Hill strain), adenovirus (CAV-2 cepa Manhattan), virus parainfluenza (cepa NL-CPI-5), parvovirus canino (NL-35-D) propagado en una línea celular establecida, y un cultivo inactivo de *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

[0064] QUANTUM DOG 7 por Schering-Plough Animal Health contiene moquillo, adenovirus de tipo 2, parvovirus, vacuna de virus parainfluenza de tipo 2 (viva) y vacuna *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae* activo.

[0065] CANIGEN DHPPi por Virbac Ltd. es una vacuna de virus atenuado liofilizado conteniendo virus de moquillo, adenovirus canino (CAV2), parvovirus canino y virus parainfluenza canino cultivado en cultivo de tejido de línea celular.

[0066] CANIGEN Ppi por Virbac Ltd. es una vacuna de virus liofilizado vivo atenuado, conteniendo parvovirus canino y virus parainfluenza canino cultivado en cultivo de tejido de línea celular. Tipicamente, un agente capaz de aumentar la respuesta inmune en un perro contra CHV comprende CHV atenuado o inactivo, o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un ácido nucleico codificando dicho fragmento inmunogénico.

[0067] Agentes adecuados que aumentan una respuesta inmune en un perro contra CHV son conocidos para una persona con conocimiento en la técnica. Por ejemplo EURICAN Herpes 205 por Merial es una vacuna subunidad purificada contra herpesvirus canino que es indicada para la inmunización activa de hembras preñadas para prevenir la mortalidad, signos y lesiones clínicas en cachorros resultantes de infecciones de herpesvirus canino adquiridos en los primeros días de vida. No está licenciada para la vacunación de perros adultos para prevención de enfermedad respiratoria.

[0068] Tipicamente, una agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* comprende *B. bronchiseptica* inactivo o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico codificando dicho fragmento inmunogénico.

[0069] Agentes adecuados que aumentan una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* son conocidos para una persona entendida en la materia. Por ejemplo, las siguientes vacunas de perro son permitidas para uso.

[0070] COUG14GUARD-B® por Pfizer Animal Health (U.S. Vet. Lic. No.: 189) contiene un cultivo de *B. bronchiseptica* inactivo. Es para la inmunización de perros saludables contra enfermedad causada por *B. bronchiseptica*, en particular tos de perrera. COUGHGUARD-B® es preparada de una cepa de *B. bronchiseptica* altamente antigénica que ha sido inactivada y procesada para no ser tóxica cuando se administre a perros. Se informa que el método de producción deja intactas las propiedades inmunogénicas de *B. bronchiseptica*.

[0071] VANGUARD® 5/B por Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.: 189) contiene cepas atenuadas de virus de moquillo (CDV), CAV-2, CPiV, y parvovirus canino (CPV) propagado en una línea celular canina establecida. El antígeno de CPV fue atenuada por paso bajo en la línea celular canina y en ese nivel de paso tiene propiedades inmunogénicas capaces de anular anticuerpos maternos. La vacuna es envasada en forma liofilizada con gas inerte en lugar en vacío. El componente bacteriano conteniendo cultivos enteros inactivos de *B. bronchiseptica* es suministrado como diluyente. El componente *B. bronchiseptica* en VANGUARDS® 5/B es preparado de una cepa altamente antigénica que ha sido inactivada y procesada para no ser tóxica cuando se administre a perros. NASAGUARO-B™ por Pfizer Animal Health (U.S. Vet. Lic. No.: 112) está compuesta de un cultivo vivo avirulento de *B. bronchiseptica* bacteria.

[0072] PROGARD®-KC por Intervet es una vacuna intranasal viva modificada conteniendo virus parainfluenza canino atenuado y cultivo vivo avirulento de *Bordetella bronchiseptica*. PROGARD®-KC es presentado en forma disecada con diluyente estéril proporcionado para reconstitución. PROGARD®-KC es para vacunación de cachorros y perros saludables susceptibles para prevención de traqueobronquitis infecciosa canina ("tos de perrera") debido a virus parainfluenza canino y *B. bronchiseptica*.

[0073] PROGARD®-KC PLUS por Intervet contiene cultivo vivo de cepas avirulentas de a *B. bronchiseptica*, adenovirus canino atenuado de tipo 2 y virus parainfluenza para administración intranasal. La vacunación con PROGARD®-KC Plus estimula inmunidad rápida local en el tracto respiratorio, inhibiendo de este modo la infección al puerto de entrada así como previniendo signos clínicos. Además de para inmunidad local, también estimula inmunidad sistemática dentro de las tres semanas de administración intranasal. El pequeño volumen (0.4 ml) y la aplicación por una fosa nasal PROGARD®-KC Plus proporciona facilidad en la vacunación, particularmente en razas pequeñas y cachorros jóvenes. PROGARD®-KC Plus es presentada en forma desecada con diluyente estéril proporcionado para reconstitución. PROGARD®-KC PLUS es para vacunación de perros saludables y cachorros de tres semanas de edad o mayores para prevención de traqueobronquitis infecciosa canina ("tos de perrera") debida a adenovirus canino de tipo 2, virus parainfluenza y *B. bronchiseptica*.

[0074] Intrac por Intervet es una vacuna viva liofilizada, conteniendo cepa de *B. bronchiseptica* S 55, para

administración intranasal. Número de licencia de producto PL 0201/4011

[0075] Nobivac KC, descrito arriba, también contiene *B. bronchiseptica*.

[0076] La vacunación sería útil especialmente pero no exclusivamente para perros antes de entrar a una perrera de internado o para la vacunación de perros en instalaciones de reproducción.

[0077] Una dosis típica de una vacuna compuesta de proteína recombinante es alrededor de 5-10 µg. Una dosis típica de una vacuna compuesta de virus inactivo es alrededor de 1-10 mg.

[0078] La invención proporciona el uso de (i) un coronavirus teniendo una proteína S con al menos 90% de identidad aminoácida con la proteína S CRCV, o un fragmento de la misma, o un ácido nucleico codificando dicha proteína S coronaviral o fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico codificando dicha proteína S coronaviral o fragmento inmunogénico de la misma, en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

[0079] La invención incluye el uso de (i) un coronavirus teniendo una proteína S con al menos 90% de identidad aminoácida con la proteína S CRCV o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico codificando dicha proteína coronaviral o fragmento inmunogénico de la misma, en la preparación de un medicamento para profilaxis de enfermedad respiratoria en un perro, típicamente ERIC.

[0080] Cuando una proteína coronavirus, o un fragmento inmunogénico de la misma, es usado en la preparación del medicamento, la proteína preferentemente tiene al menos 90%, o al menos 95% de identidad aminoácida con la porción correspondiente de la proteína S de CRCV.

[0081] Preferentemente, la proteína coronaviral usada en la preparación del medicamento es una proteína CRCV, o una modificación de la misma, como se describe aquí.

[0082] La proteína coronaviral usada en la preparación del medicamento comprende una proteína S CRCV O de tipo CRCV como se define aquí o un fragmento inmunogénico de la misma.

[0083] Más preferentemente, la proteína coronaviral usada en la preparación del medicamento comprende o consiste de la secuencia aminoácida listada en la Figura 4, o una variante inmunogénica de la misma teniendo al menos 97% de identidad con la secuencia listada en la Figura 4. Preferentemente, la variante tiene al menos 98%, o al menos 99% de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4. Más preferentemente la variante tiene al menos 99.1%, o al menos 99.2%, o al menos 99.3%, o al menos 99.4%, o al menos 99.5%, o al menos 99.6%, o al menos 99.7%, o al menos 99.8%, o al menos 99.9% de identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4.

[0084] Cuando un coronavirus es usado en la preparación de un medicamento, el coronavirus comprende una proteína S con al menos 90%, o al menos 95% de identidad aminoácida con la proteína S CRCV.

[0085] Adicionalmente el coronavirus puede comprender una proteína HE con al menos 90%, o al menos 95% de identidad aminoácida con la proteína HE de BCV. Más preferentemente el coronavirus comprende una proteína HE con al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos 99% de identidad aminoácida con la proteína HE de CRCV.

[0086] La invención también proporciona una proteína S CRCV o de tipo CRCV teniendo al menos 97% de identidad de secuencia con la secuencia listada en la Figura 4 para uso en medicina. Típicamente, la proteína S será usada en medicina veterinaria.

[0087] Típicamente, la vacuna será apropiada para la administración por vías intramusculares, subcutáneas o intranasales.

[0088] La proteína S coronavirus, o fragmento de la misma, en el medicamento puede tener al menos 90% de identidad de secuencia aminoácida con la proteína S CRCV cuya secuencia aminoácida es listada en la Figura 4, y teniendo al menos uno de V en la posición 103; V en la posición 118; D en la posición 166; M en la posición 171; K en la posición 179; P en la posición 192; S en la posición 210; H at position 235; F en la posición 267; F en la posición 388; M en la posición 407; S en la posición 436; I en la posición 440; I en la posición 447; F en la posición 501; Y en la posición 525; N en la posición 528; L en la posición 540; K en la posición 582; G en la posición 608; G en la posición 692; S en la posición 695; W en la posición 757; G en la posición 758; Q en la posición 763; T en la posición 769; P en la posición 786; H en la posición 792; R en la posición 818; P en la posición 827; V en la posición 828; F en la posición 887; D en la posición 933; F en la posición 977; T en la posición 1011; S en la posición 1018; K en la posición 1063; L en la posición 1256; y M en la posición 1257. Los aminoácidos están enumerado a partir de la M inicial al principio de la proteína S CRCV, como listado en la Figura 4.

[0089] Se aprecia que la secuencia parcial nucleótida de S CRCV puede estar fácilmente determinada por una persona con conocimiento normal en la técnica al secuenciar la inserción del plásmido contenido en la cepa de E. coli D-1 de CRCV, que ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en NCIMB Ltd. bajo número de Registro NCIMB 41146 en 25 Julio 2002. Además, este ADN puede ser usado como una sonda de hibridización, o como la base para el diseño de sondas, en el aislamiento de ácido nucleico de CRCV en perros.

[0090] Para evitar toda duda, el medicamento puede incluir proteína S coronavirus, o fragmento de la misma, teniendo al menos 90% de identidad de secuencia aminoácida con la proteína S de CRCV de la Fig. 4, y comprendiendo al menos uno de los aminoácidos específicos para la proteína S CRCV en la posición listada en la Tabla 1.

[0091] Por "proteína" también incluimos el significado de glucoproteína. La secuencia aminoácida de una glucoproteína se refiere a la secuencia aminoácida del eje de polipéptido de la glucoproteína, independientemente del tipo, número, secuencia y posición de los azúcares unidos a ésta.

[0092] Típicamente, la invención incluye una proteína aislada o recombinante, y no una proteína CRCV inalterada presente como un componente CRCV.

[0093] El medicamento puede incluir una proteína S coronavirus, o fragmento de la misma, teniendo al menos 91% de identidad de secuencia aminoácida con la proteína S de CRCV de la Fig. 4), al menos 92%, o al menos 93%, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos el 97%, o al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia aminoácida con la proteína S CRCV, y comprendiendo al menos uno de los aminoácidos específicos para la proteína S CRCV en la posición listada en la Tabla 1.

[0094] El medicamento puede también incluir una proteína S coronavirus, o fragmento de la misma, teniendo al menos

90% o al menos 95% de identidad de secuencia aminoácida con la proteína S CRCV de la Fig. 4), y comprendiendo al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10, o al menos 11, o al menos 12, o al menos 13, o al menos 14, o al menos 15, o al menos 16, o al menos 17, o al menos 18, o al menos 19, o al menos 20, o al menos 21, o al menos 22, o al menos 23, o al menos 24, o al menos 25, o al menos 26, o al menos 27, o al menos 28, o al menos 29, o al menos 30, o al menos 31, o al menos 32, o al menos 33, o al menos 34, o al menos 35, o al menos 36, o al menos 37, o al menos 38 de los aminoácidos específicos para la proteína S CRCV en las posiciones listadas en la Tabla 1.

[0095] Preferentemente, la proteína S coronavirus, o fragmento del mismo que comprende todos los 39 de los residuos aminoácidos específicos para la proteína S CRCV en las posiciones listadas en la Tabla 1.

[0096] El medicamento puede incluir una proteína S BCV, HCV o HEV o fragmento de la misma, que ha sido modificado en al menos una posición listado en la Tabla 1 para parecerse a la proteína S CRCV.

[0097] Preferentemente, la proteína S coronavirus usada en la invención es una proteína S CRCV que comprende o consiste de la secuencia listada en la Figura 4), o una variante de la misma con al menos 97% de identidad con la secuencia listada en la Figura 4. Preferentemente, la variante tiene al menos 98%, o al menos 99% de la identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4. Más preferentemente la variante tiene al menos 99.1%, o al menos 99.2%, o al menos 99.3%, o al menos 99.4%, o al menos 99.5%, o al menos 99.6%, o al menos 99.7%, o al menos 99.8%, o al menos 99.9% de identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4.

[0098] Así la variante de la proteína S coronavirus usada en la invención incluye una proteína que comprende o consiste en la secuencia listada en la Figura 4) pero tiene entre 1 y 40 diferencias aminoácidas con la secuencia listada en la Figura 4. Más preferentemente la variante tiene menos de 35, menos de 30, o menos de 25, o menos de 20, o menos de 15, o 10 o 9 o 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 diferencias aminoácidas, o una sola diferencia aminoácida, con la secuencia listada en la Figura 4.

[0099] El fragmento de la proteína S CRCV puede comprender un fragmento de la secuencia listada en la Figura 4) que comprende al menos uno de los aminoácidos específicos para la proteína S CRCV en la posición listada en la Tabla 1.

[0100] Las proteínas S coronavirus como definidas arriba pueden estar calificados aquí proteínas "CRCV" o "de tipo CRCV".

[0101] Una "proteína S CRCV" es una proteína S o fragmento de la misma que tiene la secuencia aminoácida S CRCV nativa como listada en la Figura 4), o un fragmento de la misma que comprende al menos uno de los aminoácidos específicos para una proteína S CRCV en las posiciones listadas en la Tabla 1.

[0102] Una "proteína S de tipo CRCV" es una proteína S o fragmento de la misma que no tiene secuencia aminoácida idéntica a la secuencia aminoácida S CRCV nativa (Figura 4), pero tiene al menos 90% de la identidad de la secuencia con la correspondiente región de la proteína S CRCV, y preferentemente tiene al menos uno de los aminoácidos específicos para una proteína S CRCV en las posiciones listadas en la Tabla 1.

[0103] Una "proteína S de tipo CRCV" también incluye una proteína S que no tiene una secuencia aminoácida idéntica a la secuencia aminoácida S CRCV nativa S (Figura 4), pero comprende o consiste de una variante de la secuencia listada en la Figura 4 con al menos 97% de identidad con la secuencia listada en la Figura 4. Preferentemente, la variante tiene al menos 98%, o al menos 99% de identidad de la secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4. Más preferentemente la variante tiene al menos 99.1%, o al menos 99.2%, o al menos 99.3%, o al menos 99.4%, o al menos 99.5%, o al menos 99.6%, o al menos 99.7%, o al menos 99.8%, o al menos 99.9% de la identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4.

[0104] Preferentemente, la proteína CRCV o de tipo CRCV, o fragmento de la misma, tiene una longitud de al menos 200, o al menos 300, o al menos 400, o al menos 500, o al menos 600, o al menos 700, o al menos 800, o al menos 900, o al menos 1,000, o al menos 1,100, o al menos 1,200 aminoácidos.

[0105] Preferentemente, la proteína CRCV o de tipo CRCV, o fragmento de la misma, tiene menos de unos 1,300 aminoácidos de longitud. Más preferentemente la proteína CRCV o de tipo CRCV, o fragmento del mismo, tiene menos de alrededor de 1,200, tiene menos de alrededor de 1,100, tiene menos de alrededor de 1,000, tiene menos de alrededor de 900, tiene menos de alrededor de 800, tiene menos de alrededor de 700, tiene menos de alrededor de 600, tiene menos de alrededor de 500, tiene menos de alrededor de 400, tiene menos de alrededor de 300 aminoácidos de longitud.

[0106] Proteínas CRCV pueden estar aisladas de CRCV, o pueden ser hechas usando técnicas de química de proteína por ejemplo usando proteólisis parcial de proteínas aislada (bien exólicamente o endólicamente), o por síntesis ex novo. Alternativamente, las proteínas CRCV, así como las proteínas de tipo CRCV, pueden hacerse por tecnología de ADN recombinante. Técnicas adecuadas para clonación, manipulación, modificación y expresión de ácidos nucleicos, y purificación de proteínas expresadas, son bien conocidas en la técnica y son descritas por ejemplo en Sambrook et al (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 3rd edition, Sambrook et al (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

[0107] Fragmentos más cortos de proteínas CRCV y de tipo CRCV, por ejemplo péptidos, pueden ser sintetizados usando técnicas standard. Péptidos pueden estar sintetizados por el modo poliamida Fmoc de síntesis de péptido de fase sólida como descrito por Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46,3433 y referencias del mismo. Protección de grupo N-amino temporal es llevada a cabo por el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Escisión repetitiva de este grupo de protección base lábil es efectuada usando 20% de piperidina en N, N-dimetilformamida. Las funcionalidades de cadena lateral pueden ser protegidas como sus éteres de butilo (en el caso de treonina de serín y tirosina), ésteres de butilo (en el caso de ácido glutámico y ácido aspártico), derivado de butiloxycarbonil (en el caso de lisina y histidina), derivado de tritilo (en el caso de cisteína) y derivado de 4-metoxi-2,3, 6- trimetilbencenosulfonilo (en el caso de arginina).

[0108] Donde glutamina o asparagina son residuos terminales C, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para protección de las funcionalidades amida de cadena lateral. El soporte de la fase sólida esta basado en un polímero polidimetil-acrilamida constituido de los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero-eje central), diamina de bisacriloletileno (reticulante) y éster de metilo acrilolsarcosina (agente funcional). El agente unido escindible péptido-a-resina usado es el derivado de ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético ácido-lábil. Todos los derivados aminoácidos son añadidos como sus derivados anhídridos simétricos preformados con la excepción de asparagina y glutamina, las

cuales son añadidas usando un procedimiento de acoplamiento inverso mediado por N, N-diciclohexilo- carbodiimida/1-hidroxibenzotriazola . Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección son controladas usando procedimientos de ensayo de ninhidrina, ácido sulfónico trinitrobenzeno o isotina. Una vez terminada la síntesis, los péptidos son escindidos del soporte de resina con eliminación concomitante de grupos de protección de cadena lateral por medio de tratamiento con 95% de ácido trifluoroacético conteniendo un 50% de mezcla de barredores. Los barredores usados comúnmente son aretaneditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que es sintetizado. Ácido trifluoroacético es eliminado por evaporación in vacuo, con posterior trituración con éter dietilo otorgando el péptido crudo. Cualquier barredor presente se elimina por un simple procedimiento de extracción que en liofilización de fase acuosa otorga el péptido crudo libre de barredores. Reactivos para síntesis de péptidos están generalmente disponibles de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UK. La purificación puede ser efectuada por una cualquiera, o una combinación de, técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio de iones y (principalmente) cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. El análisis de péptidos puede ser llevado a cabo usando cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, análisis de aminoácidos después de hidrólisis ácida y por análisis espectrométrico de cromatografía de capa de masas del bombardeo veloz de átomos (BVA), cromatografía líquida de alto rendimiento de fase invertida, análisis aminoácido tras hidrólisis ácida y por medio de análisis espectrométrico de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB).

[0109] Un polinucleótido que codifica una proteína S CRCV o de tipo CRCV o el complemento de la misma, puede ser usado para crear la proteína S.

[0110] Preferentemente, el polinucleótido codifica una S de CRCV.

[0111] More preferentemente, el polinucleótido codificando la proteína S CRCV comprende o consiste de la secuencia listada en la Figura 3.

[0112] Se aprecia que la secuencia listada en la Figura 3) contiene una Y en la posición 3531, que se refiere a o bien C o T. En ambos casos el correspondiente aminoácido es Ile. Así un polinucleótido codificando una proteína S CRCV que comprende o consiste en la secuencia listada en la Figura 3, puede tener C en la posición 3531. Además del polinucleótido codificando una proteína S CRCV que comprende o consiste de la secuencia listada en la Figura 3, puede tener T en la posición 3531.

[0113] El polinucleótido S CRCV puede comprender un fragmento de la secuencia listada en la Figura 3, que codifica una proteína teniendo al menos uno de los aminoácidos específicos para la proteína S CRCV en la posición listada en la S Tabla 1, o el complemento del mismo.

[0114] Se refiere aquí a los polinucleótidos como se definen arriba como polinucleótidos CRCV o o de tipo CRCV.

[0115] Un "polinucleótido de tipo CRCV" es un polinucleótido que no tiene una secuencia base idéntica a toda o un fragmento de la secuencia ADNc de CRCV nativa como listada en la Figura 3, pero que codifica una proteína S CRCV o de tipo CRCV como definido arriba, o el complemento del mismo.

[0116] El CRCV es un virus ARN de cepa positiva. El polinucleótido puede ser ADN o ARN. El ARN puede ser ARN de cepa positiva o negativa. El ADN puede ser ADN de una sola cepa o doble cepa. single or double stranded ADN.

[0117] Técnicas apropiadas para clonar y secuenciar un ADNc de un virus de ARN de cepa positiva tal como CRCV son bien conocidas en la técnica y son descritas por ejemplo en Sambrook *et al* 2001

[0118] Los polinucleótidos de CRCV o de tipo CRCV pueden ser de cualquier tamaño adecuado. Sin embargo, para ciertos propósitos, tal como detectar o amplificar, es preferido si el ácido nucleico tiene menos de 3,000, más preferentemente menos de 1000, más preferentemente aún de 10 a 100, y de preferencia adicional de 15 a 30 pares de bases (si el ácido nucleico es bicatenario) o bases (si el ácido nucleico es de una sola cadena). Como es descrito de modo mas completo abajo, oligonucleótidos de ADN de una sola cadena, adecuados para usar como detectores de hibridización o como iniciadores en una reacción en cadena de polimerasa, son particularmente preferidos.

[0119] Oligonucleótidos que pueden amplificar específicamente, o hibridizar a polinucleótidos S de CRCV, al contrario que polinucleótidos BCV, HCV, HEV o S CCV entéricos S, pol o HE, son particularmente preferidos. Los oligonucleótidos adecuados pueden determinarse por una persona experta en la técnica por referencia a las comparaciones de la secuencia nucleótida en las Figuras 6, 8, 9 y 15.

[0120] Se aprecia que los oligonucleótidos CRCV o de tipo CRCV pueden, incluso bajo condiciones altamente rigurosas, hibridizar al ácido nucleico, sea ARN o ADN, de HCV, BCV, y HEV así como CRCV. Sin embargo, se prefiere si los oligonucleótidos CRCV o de tipo CRCV hibridizan a ácido nucleico de CRCV bajo condiciones más astringentes que al ácido nucleico de HCV, BCV or HEV. Esto puede ser determinado bien experimentalmente o por una comparación de la secuencia oligonucleótida con las secuencias respectivas de CRCV, HCV, BCV and HEV, como es bien sabido para una persona experta en la técnica. (Sambrook *et al* 2001).

[0121] Preferentemente, los oligonucleótidos no hibridizan ácidos nucleicos CCV entéricos bajo condiciones rigurosas (ver abajo)

[0122] Convenientemente, los polinucleótidos u oligonucleótidos de CRCV o de tipo CRCV además comprenden una etiqueta detectable.

[0123] Por "etiqueta detectable" se incluye cualquier etiqueta conveniente radioactiva tal como ^{32}P , ^{33}P o ^{35}S las cuales puede ser incorporadas fácilmente dentro de una molécula de ácido nucleico usando métodos bien conocidos; es también incluida cualquier etiqueta quimiluminiscente o fluorescente conveniente que pueda ser fácilmente incorporada dentro de un ácido nucleico. Además el término "etiqueta detectable" también incluye una fracción que puede ser detectada por medio de enlace a otra fracción (tal como biotina que puede ser detectada al enlazar una streptavidina); y una fracción, tal como un enzima, que puede ser detectado en base a su capacidad para convertir un compuesto incoloro en un compuesto de color, o viceversa (por ejemplo, la fosfatasa alcalina puede convertir o- nitrofenilfosfato incoloro en o-nitrofenol con color). Convenientemente, la sonda de ácido nucleico puede ocupar una cierta posición en un orden fijado y si un ácido nucleico hibridiza a esto puede determinarse por referencia a la posición de hibridización en el orden fijado.

[0124] Etiquetar con [^{32}P] dCTP puede ser llevado a cabo usando un kit de etiquetado iniciador aleatorio Rediprime® suministrado por Amersham.

[0125] Iniciadores que son adecuados para uso en una reacción en cadena de polimerasa (PCR; Saiki et al (1988) Science 239, 487-491) son preferidos. Iniciadores de PCR adecuados pueden tener las siguientes propiedades:

[0126] Es bien sabido que la secuencia en el extremo 5' del oligonucleótido no necesitan combinar con la secuencia objetivo para ser amplificada.

[0127] Es común que los iniciadores de PCR no contengan ninguna estructura complementaria de ellos más largas que 2 bases, especialmente en sus extremos 3', porque este rasgo puede promover la formación de un producto artefactual llamado "dímero iniciador". Cuando los extremos 3' de los dos iniciadores hibridizan, forman un complejo "molde iniciado", y la extensión iniciadora resulta en un producto corto duplex llamado " dímero iniciador ".

[0128] Una estructura secundaria interna debiera ser evitada en iniciadores. Para PCR simétricos, un contenido de 40-60% de G+C es recomendado a menudo para ambos iniciadores, con tramos no largos de cualquier base. Los cálculos clásicos de temperatura de fusión usados en conjunción con estudios de detección de hibridización de ADN a menudo predicen que un iniciador dado debería flamear a una temperatura específica o que los 72° de temperatura de extensión disociarán el híbrido iniciador/ molde prematuramente. En la práctica, los híbridos son más efectivos en el proceso de PCR que lo que generalmente se predice por cálculos simples de T_m .

[0129] Temperaturas de flameado óptimas pueden ser determinadas empíricamente y pueden ser más elevadas que las predichas. La polimerasa de ADN *Taq* tiene actividad en la región 37-55°C, de forma que la extensión iniciadora ocurrirá durante el paso de flameado y el híbrido será estabilizado. Las concentraciones de los iniciadores son iguales en PCR convencionales (simétricas) y, típicamente, dentro de 0.1 a 1 μ M.

[0130] Será además apreciado que si una reacción de amplificación de control va a ser llevada a cabo, por ejemplo usando iniciadores complementarios a un gen expresado ubicuamente, puede ser beneficioso que los productos del control y productos de CRCV o de tipo CRCV sean de diferentes tamaños, de forma que los dos productos pueden ser distinguidos por los medios de detección empleados, por ejemplo por movilidad en electrophoresis de gel agarosa. Sin embargo, puede ser deseable que los dos productos sean de tamaño similar, por ejemplo ambos entre 100 y 1000, o entre 100 y 600 nucleótidos de largo. Esto puede ayudar al análisis de los productos, por ejemplo por electroforesis, y puede también significar que el control y las reacciones de amplificación de CRCV o de tipo CRCV pueden tener unas características de rendimiento similares, en términos, por ejemplo de índices relativos de acumulación de producto en diferentes etapas durante la reacción.

[0131] Cualquiera de los protocolos de amplificación de ácido nucleico puede ser usado incluyendo la reacción en cadena de polimerasa, Qβreplicase y ligasa. También, NASBA (amplificación basada en la secuencia ácido nucleico) también llamada 3SR, puede ser usado como descrito por Compton (1991) Nature 350, 91-92 and AIDS (1993), Vol 7 (Suppl 2), S108 o SDA (amplificación de desplazamiento de cadena) puede ser usada como descrito por Walker et al (1992) Nucl. Acids Res. 20,1691-1696. La reacción en cadena de polimerasa es preferida particularmente por su simplicidad.

[0132] Cuando un par de ácidos nucleicos adecuados de la invención son usados en un PCR es conveniente detectar el producto por gel de electroforesis y coloración de bromuro de etidio. Como una alternativa, es conveniente usar un oligonucleótido etiquetado capaz de hibridizar al ADN amplificado como una sonda. Cuando la amplificación es por PCR la sonda de oligonucleótido hibridiza a la secuencia interiniciadora como se define por los dos iniciadores. La sonda oligonucleótida tiene preferentemente entre 10 y 50 nucleótidos de longitud, más preferentemente entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. Puede ser más larga que el ADN amplificado o incluir uno o ambos de los iniciadores, pero en este caso, las condiciones de hibridización deberían ser tales que la sonda no debería hibridizar a los iniciadores solamente, sino únicamente a un producto amplificado que también contiene secuencia interiniciadora que es capaz de hibridizar la sonda.

[0133] La sonda puede ser etiquetada con un radionúclido tal como ^{32}P , ^{33}P y ^{35}S usando técnicas estándar, o puede ser etiquetada con un tinte fluorescente. Cuando la sonda de oligonucleótido es etiquetada por fluorescencia, el producto de ADN amplificado puede ser detectado en solución (ver por ejemplo Balaguer et al (1991). "Cuantificación de secuencias de ADN obtenidas por reacción en cadena de polimerasa usando un adsorbente de bioluminiscencia" Anal. Biochem. 195,105-110 and Dilesare et al (1993) "Un sistema de detección basado en electroluminiscencia de alta sensibilidad para cuantificación de producto PCR automatizado" Bio- Techniques 15, 152-157.

[0134] Productos de PCR pueden también ser detectados usando una sonda que puede tener un par fluoróforo-quencher o puede estar unida a un soporte sólido o puede tener una etiqueta de biotina o pueden ser detectados usando una combinación de una sonda de captura y una sonda detectora.

[0135] Los pares fluoróforo-quencher son particularmente adecuados para mediciones cuantitativas de reacciones de PCR (eg RTPCR). Polarización de fluorescencia usando una sonda adecuada puede ser usada para detectar productos PCR.

[0136] Un vector comprendiendo el polinucleótido de CRCV o de tipo CRCV puede ser usado para expresar la proteína S de CRCV o de tipo CRCV.

[0137] Plásmidos de vector procariótico típicos son: pUC 18, pUC 19, pBR322 y pBR329 disponibles de Biorad Laboratorios (Richmond, CA, USA); pTi-c99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 y pRIT5 disponibles de Pharmacia (Piscataway, NJ, USA); pBS vectors, Phagescript vectors, Bluescript vectors, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A disponibles de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA).

[0138] Un plásmido de vector de célula mamífera típica es pSVL disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). Este vector usa el promotor tardío SV40 para conducir expresión de genes clonados, siendo encontrado el nivel más elevado de expresión en células T que producen antígeno, tales como células COS-1. Un ejemplo de un vector de expresión de mamífero inducible es pMSG, también disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). Este vector usa el promotor inducible por glucocorticoide de la repetición Terminal larga del virus de tumor mamario de ratón para conducir la expresión del gen clonado.

[0139] Vectores útiles plásmidos de levadura son pRS403-406 and pRS413-416 y están generalmente disponibles de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA). Plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de Levadura (Ylps) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TUP1, LEU2 and URA3. Plasmids pRS413-416 son plásmidos de Centrómero de Levadura (YCps).

[0140] Generalmente, el polinucleótido de CRCV o de tipo CRCV es insertado dentro de un vector de expresión, tal como un plásmido, en orientación apropiada y correcto marco de lectura para expresión. Puede estar vinculado a las adecuadas secuencias nucleótidas de control regulatorio de transcripción y de traslación reconocidas por el huésped deseado anterior a la inserción del vector, sin embargo tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. Así, el polinucleótido del inserto de la invención puede estar operativamente vinculado a un promotor apropiado. Promotores eucarióticos incluyen promotores tempranos inmediatos de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores tempranos y los tardíos SV40 y los promotores LTRs retrovíricos. Otros promotores adecuados serán conocidos por los expertos en la materia. Los constructos de expresión también contienen deseablemente lugares para iniciación y terminación de transcripción, y en la región transcrita, un lugar de unión de ribosoma para traslación (WO 98/16643).

[0141] Métodos bien conocidos para aquellos con conocimiento en la técnica pueden ser usados para construir vectores de expresión conteniendo la secuencia codificadora y, por ejemplo controles apropiados transcripcionales o traslacionales. Tal método supone ligación via colas de homopolímero. Colas de homopolímero polydA (o polydC) son añadidas a grupos expuestos 3' OH sobre el fragmento de ADN para ser clonados por transferasas de deoxinucleotidil terminal. El fragmento es entonces capaz de flamear a las colas de polydT (o polydG) añadido a los extremos de un vector plásmidoligado. Los huecos dejados después de flamear pueden ser llenados con ADN polimerasa y los extremos libres unidos por ADN ligasa.

[0142] Otro método supone ligación mediante extremos cohesivos. Extremos cohesivos compatibles pueden estar generados en el fragmento y vector de ADN por la acción de enzimas adecuadas de restricción. Estos extremos flamearán rápidamente por medio de pares de bases complementarios las muescas restantes pueden ser cerradas por la acción de ADN ligasa.

[0143] Un método adicional usa moléculas sintéticas llamadas enlazadores y adaptadores. Fragmentos de ADN con extremos romos son generados por polimerasa T4 ADN o bacteriófago o ADN polimerasa I de *E. coli* que elimina términos salientes 3' y rellena extremos huecos 3'. Enlazadores sintéticos, piezas de ADN de doble cadena extremo romo que contienen secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción definidos, pueden ligarse a fragmentos de ADN con extremo roma por T4 ADN ligasa. Son digeridos posteriormente con enzimas de restricción apropiados para crear extremos cohesivos y ligados a un vector de expresión con términos compatibles. Adaptadores son también fragmentos de ADN químicamente sintetizados que contienen un extremo roma usado para ligadura pero que también posee un extremo cohesivo de ligación preformado.

[0144] Enlazadores sintéticos conteniendo una variedad de sitios de endonucleasa de restricción están comercialmente disponibles de un número de fuentes incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USA.

[0145] Un modo deseable de modificar el polinucleótido de la invención es usar la reacción en cadena de polimerasa como revelada por Saiki et al (1988) Science 239, 487- 491. En este método el ADN a ser enzimáticamente amplificado es flanqueado por dos iniciadores oligonucleótidos específicos que quedan incorporados dentro del ADN amplificado. Los iniciadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción los cuales pueden ser usados para clonar en vectores de expresión usando métodos conocidos en la técnica.

[0146] Una célula huésped transformada con el vector que comprende el polinucleótido de CRCV o de tipo CRCV puede ser usada para expresar la proteína S. La célula huésped puede ser o bien procariota o eucariota. Si el polinucleótido CRCV o de tipo CRCV, en el vector, va a ser expresado como una glucoproteína, la célula huésped es una célula huésped eucariota, y preferentemente una célula huésped mamífera.

[0147] Las células bacterianas son las células huésped procariotas preferidas y típicamente son una cepa de *E. coli* tal como, por ejemplo, las cepas *E. coli* DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, y RR1 disponibles de American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville, MD, USA (No ATCC 31343). Células huésped eucariotas preferidas incluyen levadura y células mamíferas, preferentemente células vertebradas tales como las de una línea celular fibroplástica de ratón, rata, mono o humana. Células huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501 las cuales están generalmente disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Células huésped mamíferas preferidas incluyen células de ovario de hamster chino (OHC) disponibles del ATCC como CCL61, NIH células de embrión de ratón suizo NIH/3T3 disponibles del ATCC como CRL 1658, y células COS-1 de derivado de riñón de mono disponibles de ATCC como CRL 1650. Células preferidas de insecto son células Sf9 las cuales pueden ser transfectadas con vectores de expresión baculovirus,

[0148] La transformación de huéspedes celulares apropiados con un vector es realizada por métodos bien conocidos que dependen típicamente del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de células huésped procariotas, ver, por ejemplo, Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 y Sambrook et al (2001)- Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Transformación de células de levadura es descrita en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. The method of Beggs (1978) Nature 275, 104-109 es también útil. Con respecto a las células vertebradas, reagentes útiles en transferir tales células, por ejemplo fosfato calcico y such cells, DEAE-dextran o formulaciones de liposoma, están disponibles de Stratagene Cloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USA.

[0149] La electroporación es también útil para transformar células y es bien conocida en la técnica para transformar célula de levadura, células bacterianas y células de vertebrados.

[0150] Por ejemplo, muchas especies bacterianas pueden ser transformadas por los métodos descritos en Luchansky et al (1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646 incorporados aquí por referencia. El mayor número de transformantes es consistentemente recuperado después de la electroporación de la mezcla de célula de ADN suspendida en 2.5x PEB usando 6250V por cm en 25mFD.

[0151] Métodos para transformación de levadura por electroporación son revelados en Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182.

[0152] Pueden ser usados métodos físicos para introducir ADN en células animales y plantas. Por ejemplo, la microinyección usa una pipeta muy fina para inyectar moléculas de ADN directamente dentro del núcleo de las células a ser transformadas. Otro ejemplo conlleva el bombardeo de las células con microproyectiles de alta velocidad, normalmente partículas de oro o tungsteno que han sido recubiertas con ADN.

[0153] Células exitosamente transformadas, por ejemplo células que contienen un constructo de ADN CRCV o de tipo CRCV, pueden ser identificadas por técnicas bien conocidas. Por ejemplo, una técnica de selección conlleva incorporar dentro del vector de expresión unas secuencias de ADN (marcador) que codifica para un rasgo seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para cultivo de célula eucariota, y genes resistentes a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Alternativamente, el gen para el rasgo seleccionable puede ser otro vector, que es usado para cotransformar la deseada célula huésped.

[0154] El gen marcador puede ser usado para identificar transformantes pero es aconsejable determinar cuál de las células contiene moléculas de ADN recombinante y cuál contiene moléculas de vector autoligadas. Esto puede ser logrado usando un vector clonante donde la inserción de un fragmento de ADN destruye la integridad de uno de los genes presentes en la molécula. Los recombinantes pueden por tanto ser identificados a causa de la pérdida de función del gen.

[0155] Otro método de identificar exitosamente células transformadas conlleva cultivar las células resultantes de la introducción de un constructo de expresión de la presente invención para producir la proteína S CRCV o tipo CRCV, pol o HE. Las células pueden ser cosechadas y lisadas y su contenido de ADN examinado para la presencia del ADN usando un método Duch como el descrito por Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 or Berent et al (1985) Biotech. 3, 208. Alternativamente, la presencia de la proteína en el supernatante puede ser detectada usando anticuerpos.

[0156] Además de ensayar directamente para la presencia de ADN recombinante, puede confirmarse la transformación exitosa por métodos inmunológicos bien conocidos cuando el recombinante de ADN es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, células exitosamente transformadas con un vector de expresión producen proteínas que despliegan antigenicidad apropiada. Muestras de células sospechosas de ser transformadas son cosechadas y ensayadas para la proteína usando anticuerpos adecuados.

[0157] Células huésped que han sido transformadas por el polinucleótido recombinante de CRCV o de tipo CRCV, típicamente en un vector como descrito arriba, son entonces cultivadas durante un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas conocidas por aquéllos con conocimientos en la técnica a la vista de las enseñanzas aquí reveladas para permitir la expresión de la proteína de CRCV o de tipo CRCV codificada por el polinucleótido de CRCV o de tipo CRCV, que puede ser recubierto.

[0158] La proteína de CRCV o de tipo CRCV puede ser recuperada y purificada de cultivos de célula recombinante por métodos bien conocidos incluyendo precipitación de sulfato amónico o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferentemente, de cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") es empleada para purificación.

[0159] Por ejemplo, para la expresión en un sistema baculovirus, ADN recombinante de ADN codificando el gen Spike de CRCV puede estar clonado dentro de un vector de transferencia adecuado tal como pMelBac (Invitrogen). Co-transfección con ADN de baculovirus DNA (por ejemplo Bac- N-Blue/Invitrogen) resulta en un baculovirus recombinante codificando el gen spike. Infección de una línea celular de insecto adecuada (por ejemplo Sf9, Sf21, High Five/Invitrogen) en una multiplicidad apropiada de infección lleva expresión de la proteína Spike recombinante. Expresión de proteína es confirmada por Western blot o ELISA usando reactivos apropiados (por ejemplo suero canino convalescente u otros antisueros específicos de virus).

[0160] Una proteína S de CRCV o de tipo CRCV glucosilada, codificada por el polinucleótido de CRCV o de tipo CRCV puede ser obtenida al cultivar una célula huésped eucariota, o más preferentemente mamífera, comprendiendo el polinucleótido de CRCV o el CRCV, típicamente en un vector; expresando la proteína en la célula huésped; y purificando la proteína glucosilada.

[0161] La invención será ahora descrita en más detalle con la ayuda de las siguientes Figuras y Ejemplos.

Figura 1

[0162] secuencia parcial nucleótido (250 residuos) de la polimerasa de CRCV (pol) ADNc.

Figura 2

[0163] Secuencia aminoácida parcial (83 residuos) de la proteína pol. CRCV of the CRCV pol p, derivada de la secuencia nucleótida de la Figura 1.

Figura 3

[0164] Secuencia nucleótida (4092 residuos) del CRCV Spike (S) ADNc. La Y en la posición 3531 se refiere a sea C o T.

Figura 4

[0165] Secuencia aminoácida (1363 residuos) de la proteína S de CRCV, derivada de la secuencia nucleótida de la Figura 3.

Figura 5

[0166] Consensus tree para secuencias ADNc de una región nucleótida 250 del gen polimerasa de 12 coronavirus. La secuencia obtenida del coronavirus respiratorio canino es designada T101. Los números indican valores de secuencia inicial obtenidos por análisis de 100 conjuntos de datos.

[0167] BCV: coronavirus bovino, CCV: coronavirus canino, FIPV: virus peritonitis infecciosa felino, HEV: virus encefalomiелitis hemaglutinante, IBV: virus de bronquitis infecciosa, MHV: virus de hepatitis de ratón, OC43: cepa de coronavirus humana OC43, SDAV: virus sialodacrioadenitis, TCV: coronavirus de pavo, TGEV: virus de gastroenteritis transmisible, 229E: cepa de coronavirus humano 229E, T101: coronavirus respiratorio canino (PCR producto de muestra traqueal T101)

Figura 6

[0168] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia multiple de la secuencia parcial de 250 nucleótidos de ADNc pol de CRCV (muestra T101), BCV, cepa OC43 de HCV, HEV y CCV (CCV entérico).

Figura 7

[0169] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia multiple de la secuencia parcial de 83 aminoácidos de la proteína pol de CRCV (protCRCVpol, SEC ID N°: 2) con HCV (protHCVpoly), HEV (protHEVpoly, BCV (protBCVpoly) y CECV

(CCV entérico, protCECVpol).

Figura 8

[0170] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia de la secuencia nucleótida de ADNc Spike de CRCV (CRCVSpike) ADNc Spike de CCV entérico (CECVSpike).

Figura 9

[0171] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia múltiple de los 4092 nucleótidos de la secuencia de ADNc Spike de CRCV (CRCVSpike) con ADNcs de Spike BCV (BCVSpike), HCV (HCVSpike) y HEV (HEVSpike). La Y en la posición 3531 en la secuencia CRCV se refiere a o bien C o T.

Figura 10

[0172] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia múltiple de la secuencia aminoácida 1363 de la proteína Spike de CRCV (CRCVSpikepr) con BCV (BCVSpikepro), HCV (HCVSpikepro), HEV (HEVSpikepro) y proteínas Spike de CCV entérico (CECVSpikepr).

Figura 11

[0173] RT-PCR usando juego anidado de iniciadores (Spike 1 y 2 seguidos de Spike 3 y 4) BCV: Muestra de control positiva de coronavirus bovino; A72: Células A72 negativas de coronavirus; H2O: mezcla de PCR sin ADN; T5 - T21: Muestras traqueales de perros de estudio. La electroforesis en gel de azarosa muestra productos PCR del tamaño esperado de 442bp para el control positivo (BCV) y muestras T12 y T21.

Figura 12

[0174] Comparación de la prevalencia de enfermedad respiratoria en dos grupos de perros. Perros en grupo 1 fueron positivos para anticuerpos de suero para coronavirus respiratorio en el día de entrada en la perrera, perros en grupo 2 fueron negativos. El gráfico muestra el porcentaje de perros desarrollando enfermedad respiratoria en grupo 1 comparado con grupo 2 ($p < 0.001$). n es el número total de perros en cada grupo.

Figura 13

[0175] Secuencia nucleótida parcial (497 residuos) del gen hemaglutinina/esterasa (HE) CRCV. La secuencia corresponde a nucleótidos 418 to 914 de los genes HE de BCV (GenBank M84486) y HCV OC43 (GenBank Acceso No. M76373).

Figura 14

[0176] Secuencia parcial aminoácida (165 residuos) de la proteína HE de CRCV HE, derivada de la secuencia nucleótida de la Figura 13. Esta secuencia corresponde a residuos aminoácidos 140 to 304 de BCV (GenBank M84486) y HCV OC43 (GenBank Accession No. M76373).

Figura 15

[0177] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia múltiple de una secuencia parcial de 497 nucleótidos del gen hemaglutinina/esterasa (HE) de CRCV (coronavirus respiratorio canino) con BCV (cepa de coronavirus bovino LY138, (SEC ID N°: 23, tomado de Genbank Accession No. AF058942), OC43 (cepa coronavirus humano OC43, tomado de Genbank Accession No. M76373), HECV (coronavirus entérico humano, tomado de Genbank Accession No. L07747), y HEV (virus encefalomiелitis hemoglutinante, tomado de Genbank Accession No. AF481863).

Figura 16

[0178] CLUSTAL X (1.8) alineamiento de secuencia múltiple de una secuencia parcial de 165 aminoácidos de la proteína HE de CRCV (coronavirus respiratorio canino) con BCV (cepa coronavirus bovino LY138 tomado de Genbank Accession No. AF058942), OC43 (cepa de coronavirus humano OC43, tomada de Genbank Accession No. M76373), HECV (coronavirus entérico humano, tomada de Genbank Accession No. L07747), y HEV (virus encefalomiелitis hemoglutinante, tomado de Genbank Accession No. AF481863). Los tres aminoácidos específicos de CRCV F, N y L son indicados en negrita y están subrayados.

Figura 17

[0179] RT-PCR usando iniciadores de consenso HE1 y HE2 dirigidos para el gen HE de BCV y HCV (cepa OC43). La electroforesis en gel de agarosa muestra un producto PCR del tamaño esperado de 497bp para el control positivo de BCV y para cuatro muestras traqueales de perros de estudio (T90, T91, T101 and T105), y no para células negativas de coronavirus A72 o el PCR mix sin ADN (H2O). 1 kb indica una norma de tamaño molecular (Promega).

Figura 18

[0180] Estrategia de clonación de gen Spike CRC.

Ejemplo 1: Detección de un coronavirus novedoso asociado con enfermedad respiratoria infecciosa canina

Resumen

[0181] Una investigación sobre las causas de enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) fue llevada a cabo en una perrera grande de acogida. Muestras de tejido tomadas del tracto respiratorio de perros enfermos fueron ensayadas para la presencia de coronavirus usando RT-PCR con iniciadores conservados para el gen de polimerasa. Los análisis de secuencia de cuatro muestras positivas mostraron la presencia de un coronavirus novedoso con alta semejanza a tanto coronavirus bovino y humano (cepa OC43) en sus genes Spike y polimerasa mientras que había una baja similitud con genes comparables en el coronavirus entérico canino. Este coronavirus respiratorio canino (CRCV) fue detectado por RT-PCR en muestras traqueales 32/119 y de pulmón 20/119 siendo detectada la prevalencia más elevada en perros con síntomas clínicos leves. Análisis serológicos mostraron que la presencia de anticuerpos contra el CRCV en el día de entrada dentro de la perrera redujo el riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria.

Materiales y Métodos

Población de Estudio

[0182] Perros procedentes de una perrera de acogida bien establecida con un historial de enfermedad respiratoria endémica fueron controlados para este estudio. Al entrar en la perrera, todos los perros fueron vacunados con KAVAK DA2 PiP69 (Fort Dodge) una vacuna atenuada viva para moquillo, adenovirus canino de tipo 2, parainfluenzavirus canino y parvovirus canino. También, fue usada una vacuna de leptospirosis inactivada (Fort Dodge). El estado de salud de cada perro fue evaluado dos veces al día por un clínico veterinario y los síntomas respiratorios fueron clasificados como sigue: 1: sin signos respiratorios, 2: tos leve, 3: tos y flujo nasal, 4: tos, flujo nasal e inapetencia, 5: bronconeumonía. El estado general de salud de los perros fue clasificado como sigue: 1: buena salud, 2: salud pobre, 3:

salud muy pobre. La edad, raza y sexo de los perros fue registrada.

[0183] Para 119 perros fue realizado un examen completo post mortem. Las muestras de tejido fueron almacenadas a -70°C hasta nuevo uso.

[0184] Muestras de suero fueron recogidas de 111 perros en el día de entrada a la perrera de acogida. Para 81 perros un suero de seguimiento estuvo disponible el día 7 y para 11 perros un suero estuvo disponible el día 21 desde la entrada.

[0185] De los 111 perros, 30 permanecieron saludables durante los 21 días entre la primera y la última muestra de suero mientras que 81 perros desarrollaron enfermedad respiratoria.

[0186] Sueros de 35 perros alojados en otro lugar fueron obtenidos del servicio diagnóstico del Royal Veterinary College. Estos sueros habían sido enviados para análisis bioquímico por razones varias. Cinco de esos sueros fueron de 18 beagles sin historial de enfermedad respiratoria. Los sueros fueron almacenados rutinariamente a -20°C.

Extracción de ARN y RT-PCR

[0187] ARN fue extraído de tejido traqueal y pulmonar de 119 perros usando TriReagent (Sigma). Aproximadamente fueron usados 25-50 mg de tejido homogeneizado y el ARN fue extraído como el fabricante recomendaba.

[0188] Síntesis de ADNc fue realizada usando Random Hexamers (Roche) y ImPromII retrotranscriptasa (Promega).

[0189] El gen polimerasa de coronavirus es conocido ser altamente conservativo, y ha sido previamente usado para análisis filogenético de esta familia de virus (Stephensen *et al.*, 1999). Para la detección de coronavirus fue usada una modificación de los iniciadores 2Bp y 4Bm dirigidos contra el gen polimerasa como se describe por Stephensen *et al.* (1999) (Conscoro5: 5' -ACT-CAR-ATG-AAT-TTG-AAA-TAT-GC (SEC ID N°: 31); y Conscoro6: 5' -TCA-CAC-TTA-GGATAR- TCC-CA (SEC ID N°: 32)).

[0190] PCR fue realizada usando polimerasa Taq (Promega) en el buffer de reacción provisto conteniendo una concentración final de 2.5 mM MgCl₂ y 0.5mM de iniciadores. Para PCR con los iniciadores Conscoro5 y Conscoro6 se usó el siguiente perfil de temperatura: Después de la desnaturalización a 95°C durante 5 min, fueron llevados a cabo 10 ciclos a 95°C durante 1 min, flameado a 37°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1min. Esto fue seguido de 10 ciclos usando una temperatura flameante de 45°C, 10 ciclos a una temperatura flameante de 50°C y 10 ciclos a una temperatura flameante de 53°C seguida de una extensión final de 72°C durante 10 min.

[0191] Una fracción de 20ml de producto de PCR fue analizada en un 1.5% de gel de agarosa y manchada encima de una membrana de nylon (Roche) después de electroferesis. La membrana de nylon fue hibridizada con una sonda oligonucleótida específica para el producto PCR a 37°C durante la noche (Sonda Conscoro: AAG-TTT-TAT-GGY-GGY-TGG-GA). La sonda fue 3'A-acolada con Digoxigenin- dUTP y fue detectada usando conjugado anti-Digoxigenin y sustrato quimioluminescente CSPD (Roche).

[0192] Secuencias de iniciador específico para el gen Spike fueron derivadas de un alineamiento de la región Spike de una cepa de coronavirus bovina LY-138 (AF058942) y cepa coronavirus humano OC43 (L14643).

[0193] Un PCR fue realizado con los iniciadores Spike 1 y Spike 2, seguidos por un PCR anidado usando los iniciadores Spike 3 y Spike 4 y 2ml del producto de la primera amplificación.

[0194] Los números entre paréntesis se refieren a la posición nucleótida en el genoma coronavirus bovino.

Spike 1: 5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT (25291-25314)

Spike 2: 5' -CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG (25912-25890)

Spike 3: 5' -GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-CTG (25320-25339)

Spike 4: 5' -GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAG-AG (25762-25742)

[0195] El perfil de temperatura usado fue desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, flameado a 55°C durante 40 seg y elongación a 72°C durante 1 min. La extensión final fue realizada a 72°C durante 10 min. El anidado PCR produjo un fragmento de 442bp.

[0196] Productos PCR fueron clonados en el vector pGEM-T-easy vector (Promega) y secuenciados usando el kit secuenciador de ciclo iniciador etiquetado fluorescente Thermo sequenasa con 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia) usando iniciadores etiquetados Cy5.

Análisis filogenético

[0197] Un alineamiento de la secuencia de ADNc de 250 bp del gen polimerasa a las secuencias correspondientes de 11 coronavirus fue realizado usando ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

[0198] La relación filogenética con coronavirus conocidos fue analizada usando el paquete Phylip 3.6 package (Felsenstein, 1989). Los alineamientos fueron seguidos de un análisis de inicialización usando el programa Seqboot. Los juegos de datos obtenidos fueron usados para un análisis de parsimonia máxima usando el programa ADNpars y un árbol de consenso fue calculado usando Consense. Los árboles resultantes fueron dibujados usando el programa Treeview (Page, 1996).

ELISA

[0199] Un antígeno ELISA para coronavirus bovino o coronavirus canino entérico (CECV) (los antígenos son una preparación de cultivos de células infectadas por virus obtenidas de Churchill Applied Biosciences, Huntingdon, UK) fue suspendido de nuevo en PBS en la concentración recomendada por el fabricante e incubado en una placa de 96 pocillos (Falcon) durante la noche a 37°C.

[0200] Las placas fueron lavadas con PBS y bloqueado con PBS conteniendo 5% de leche desnatada en polvo durante 30 min. El suero fue disuelto 1:100 en buffer bloqueador e incubado en las placas durante 1h. Después de lavarse con PBS/ 0.05% Tween 20 (Sigma), un conjugado de IgG antiperro de conejo etiquetado con peroxidasa (Sigma) fue añadido (1:5000 in PBS/0.05% Tween 20) durante 1 h. Las placas fueron incubadas con sustrato de color (OPD, Sigma) durante 10 min y la reacción fue parada añadiendo 2M H₂SO₄. La adsorción fue determinada en un fotómetro ELISA a 492nm.

Cultivo de virus

[0201] El aislamiento de virus es realizado en fibroblastos de pulmón canino adulto (paso 3 a 7), MDCK y células A72. (Se aprecia, sin embargo, que el aislamiento del virus podría ser realizado usando células primarias o líneas celulares como MDCK o A72 (canino), MDBK (bovino), HRT-18 (línea celular de tumor rectal humano) y Vero (Mono Verde Africano). Los fibroblastos de pulmón son mantenidos en MEM con 20% de suero fetal de ternera (FCS), MDCK y las

células A72 son mantenidas en MEM con 5% FCS. Muestras de tejido traqueal (approx. 25mg) son homogeneizadas usando un escalpelo y mezcladas vigorosamente en 1ml MEM conteniendo Penicilina (100U/ml), Estreptomina (0.1mg/ml), Amfotericina B (2.5mg/ml) y Tripsina (1mg/ml). Las muestras son centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min. y el supernatante es usado para inocular cultivos de células. Después de 30 min. a 37°C el supernatante es eliminado y el medio de mantenimiento añadido a los cultivos. Los cultivos son pasados 3 veces en ausencia de un efecto citopático. Entonces, se extrae ARN de las células y se realiza RT-PCR para detectar la presencia de CRCV.

Análisis estadístico

[0202] Los datos fueron analizados usando la prueba chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher y valores p por debajo de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

PCR usando iniciadores de consenso para el gen polimerasa de ARN coronavirus

[0203] Usando los iniciadores Consco5 y Consco6, fue analizado ADNc obtenido de 40 muestras traqueales por RTPCR.

[0204] De ellas, 7 fueron encontradas positivas por PCR e hibridación posterior (17.5%).

[0205] Los productos PCR fueron clonados y secuenciados (Figuras 1 y 2) y la secuencia de datos fue comparada para secuencias virales disponibles usando el programa de búsqueda FASTA (Pearson, 1990).

[0206] La comparación de la secuencia polimerasa ADNc coronavirus obtenida de 4 de las muestras traqueales caninas para otras secuencias coronavirus reveló que eran más similares a los datos de secuencia de cepa BCV Quebec y LY138 (Genbank Accession Nos. AF220295 y AF058942, respectivamente) y cepa de coronavirus humano OC43 (Genbank Accession No. AF124989).

[0207] La similitud en la secuencia de 250 bp analizada fue 98.8% para BCV Quebec, y 98.4% para BCV LY138 y los genes pol HCV, mientras que fue únicamente 68.53% para gen pol 1-71 de cepa CCV (Figuras 6 y 7).

[0208] Un alineamiento de la secuencia novedosa con las secuencias correspondientes de 11 coronavirus y análisis filogenético usando el método de parsimonia máxima resultó en el árbol de consenso mostrado en la Figura 5. La secuencia de ADNc obtenida de una muestra traqueal (T101) fue hallada en una rama común con coronavirus bovino, coronavirus humano - OC43 y virus de encefalomiелitis hemaglutinante.

[0209] El virus fue llamado coronavirus respiratorio canino (CRCV).

PCR usando iniciadores para el gen Spike

[0210] Para análisis adicional de la secuencia de ARN de CRCV, un alineamiento del ARN para el gen Spike de la cepa LY 138 (AF058942) y la cepa OC43 de coronavirus humano (L14643) fue realizado usando Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Regiones de consenso fueron elegidas para la selección de los conjuntos de iniciador anidados Spike 1-2 y Spike 3-4 (Figura 11). El análisis de PCR fue realizado con el ADNc obtenido de 119 muestras traqueales y de pulmón usando iniciadores anidados.

[0211] En total 32 muestras traqueales (26.9%) y 20 muestras de pulmón (16.8%) fueron halladas positivas por PCR anidado. Para ocho perros fue obtenido un resultado positivo PCR para ambas, tráquea y pulmón.

[0212] El análisis de la secuencia de los productos PCR obtenidos a partir de tejidos de 6 perros diferentes mostraron secuencias idénticas de ADN para esos ADNcs (Figuras 3 y 4). Una comparación con secuencias Spike de coronavirus conocidas usando el programa FASTA reveló una similitud de 98.1% con coronavirus bovino y una similitud de 97.8% con OC43 de coronavirus humano (Figuras 9 y 10).

PCR usando iniciadores para el gen HE

[0213] El coronavirus bovino y otro grupo II de coronavirus contienen una proteína estructural adicional, la hemaglutinina/esterasa (HE). A causa de la alta semejanza de CRCV con BCV, analizamos la presencia de un gen HE en CRCV.

[0214] Un alineamiento de las secuencias de genes HE de BCV y OC43 HCV fue usado para diseñar los iniciadores HE1 y HE2 (Tabla 2). Cuatro muestras traqueales que habían sido previamente identificadas como positivas para ARN de coronavirus por RT-PCR con iniciadores para el gen S fueron ensayadas por RT-PCR con el conjunto iniciador para el gen HE. Las cuatro muestras mostraron una banda PCR del tamaño esperado después de electroforesis con gel de agarosa (Figura 17).

Tabla 2: Iniciadores diseñados a partir de un alineamiento de los genes hemaglutinina/esterasa de BCV (GenBank Accession No. M84486) y HCV OC43 (GenBank Accession No. M76373)

Nombre	Secuencia	Localización en gen HE de BCV
HE1	5'-TAT-CGC-AGC-CTT-ACT-TTT-GT	418-437
HE2	5'-ACC-GCC-GTC-ATG-TTA-TCA-G	914-896

[0215] La secuencia del producto PCR de CRCV obtenido usando iniciadores HE 1 y HE 2 es dada en la Figura 13, y su secuencia aminoácida predicha es listada en la Figura 14. Una comparación de esas secuencias nucleótidas y aminoácidas con los correspondientes fragmentos de otros coronavirus relacionados es mostrada en las Figuras 15 y 16. Se mostró que tres aminoácidos eran únicos para CRCV, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Aminoácidos únicos en gen HE de CRCV

Aminoácido en CRCV	Aminoácido en BCV/HECV/HCV/HEV	Posición en BCV/HECV/HCV/HEV	Posición en productos PCR HE1 HE2
F (Phe)	L (Leu)	235	96
N (Asn)	T (Thr)	242	103
L (Leu)	V (Val)	253	114

[0216] Las posiciones aminoácidas en BCV, HECV, HCV y HEV son numeradas a partir de la inicial M (que es número 1) al principio de las proteínas HE OC43 de BCV y HCV (GenBank Accession Nos. M84486 y M76373, respectivamente).

Asociación de muestras positivas de PCR con signos respiratorios

[0217] Usando iniciadores para el gen Spike, fueron analizadas muestras traqueales y de pulmón provenientes de 119 perros por RT-PCR para CRCV. De ellas 42 eran de perros sin signos respiratorios (grado 1), 18 perros habían mostrado signos respiratorios leves (grado 2), 46 habían mostrado moderados (grado 3) y 13 signos respiratorios severos (grados 4 y 5). Grados 4 y 5 fueron unidos debidos al bajo número de casos en estos grupos.

[0218] Tabla 4 muestra los resultados de PCR para coronavirus en perros con diferentes grados de enfermedad respiratoria. Específicamente, la Tabla 4 muestra los resultados de RT-PCR a partir de muestras traqueales y de pulmón de 119 perros con diferentes signos respiratorios (ninguno a severo) usando un PCR anidado dirigido contra el gen Spike coronavirus así como el número de muestras positivas del número total de muestras y el porcentaje de muestras positivas (entre paréntesis).

Tabla 4: resultados de RT-PCR para muestras traqueales y de pulmón

Signos respiratorios	Traquea: Muestras positivas	Muestras positivas de pulmón	Muestras positivas de tráquea y pulmón
Ninguno	11/42 (26.2%)	8/42 (19.1%)	2/42
Leve	10/18 (55.6%)	4/18 (22.2%)	4/18
Moderado	9/46 (19.6%)	8/46 (17.4%)	2/46
Severo	2/13 (15.4%)	0/13	0/13

Establecimiento de un ensayo serológico para CRCV

[0219] A causa de la homología del ADNc Spike de CRCV a la región Spike del coronavirus bovino, un antígeno ELISA para BCV fue usado para análisis serológico de CRCV.

[0220] Se ensayaron sueros de cinco perros sin historial de enfermedad respiratoria infecciosa que no habían sido alojados en la perrera investigada. Los valores OD son de -0.013 a 0.39 con un valor OD de media de 0.154. Además, suero de perros admitidos a una clínica veterinaria por razones varias fueron ensayados para anticuerpos para coronavirus. De ellos, 20 muestras mostraron un OD de <0.4 (-0.46 a 0.396) y 10 muestras mostraron un OD de >1.0 (1.012 a 1.949). Muestras con un OD de 0.6 o por encima fueron consideradas positivas posteriormente.

Comparación de la respuesta inmune a CRCV de perros con y sin enfermedad respiratoria

[0221] Se realizó el ELISA antígeno de BCV usando sueros pareados de 111 perros de la perrera de estudio. De éstos, 81 perros habían mostrado síntomas de enfermedad respiratoria durante un periodo de 21 días y 30 habían permanecido saludables.

[0222] Del grupo de perros con enfermedad respiratoria, 17 fueron positivos para anticuerpos para CRCV en el día de entrada dentro de la perrera y 64 fueron negativos.

[0223] De los 64 perros con anticuerpos no detectables a BCV el día uno, 63 se probaron positivos el día 21. Todos los 46 perros de esos 63 para los cuales una muestra el día 7 estaba disponible dieron negativo el día 7. Por tanto 63 perros mostraron una suero conversión durante el periodo de estudio por lo tanto únicamente un perro permaneció negativo.

[0224] De los 31 perros que habían permanecido sanos, 17 tenían anticuerpos a CRCV en el día de entrada. Todos los 13 perros que fueron negativos el día 1 dieron negativo el día 7 pero mostraron una suero conversión el día 21.

[0225] Así, de los 34 perros que eran positivos para anticuerpos para CRCV a la llegada a la perrera, 17 desarrollaron enfermedad respiratoria (50%) mientras que de los 77 perros que fueron negativos a la llegada, 64 desarrollaron signos respiratorios durante el periodo de estudio (83.1%), (Figura 12).

[0226] Por tanto perros que no habían tenido anticuerpos para CRCV a la entrada de la perrera tenían una probabilidad incrementada de desarrollar enfermedad respiratoria ($p < 0.001$).

[0227] Solamente uno de los 77 perros que eran negativos a la llegada permaneció negativo durante el periodo de estudio de 21 días mientras que 76 perros mostraron suero conversión.

Serología usando antígeno de coronavirus entérico canino (CECV)

[0228] Una prueba ELISA usando un antígeno coronavirus canino fue realizada para investigar si CRCV mostraba una reacción serológica cruzada a coronavirus entérico canino. Suero de 27 perros, previamente probado para anticuerpos a CRCV usando el antígeno BCV fueron seleccionados.

[0229] Se encontró que ocho perros tenían anticuerpos a CECV en el día de entrada en la perrera, de esos cuatro también tenían anticuerpos a CRCV. Diecinueve perros fueron hallados negativos para CECV en el día 1, 17 de éstos eran también negativos para CRCV. De los 19 perros negativos, cinco mostraron una seroconversión a CECV durante el periodo de 21 días de la investigación y 17 mostraron una seroconversión a CRCV.

[0230] El análisis de la prevalencia de enfermedad respiratoria en este grupo mostró que seis de los ocho perros (75%) que eran positivos para anticuerpos a CECV en el día 1 desarrollaron enfermedad respiratoria. Del grupo de 19 perros que no tenía anticuerpos detectables a CECV en el día 1, 15 mostraron signos de enfermedad respiratoria (78.9%), ($p = 0.594$).

Aislamiento de virus

[0231] Muestras de tejido traqueal de perro que son identificados como positivos para ARN CRCV por RT-PCR son inoculados en cultivos de fibroblastos de pulmón adulto canino y células MDCK. Para algunos ejemplos, el aislamiento de virus es también realizado sobre células A72. Los cultivos no muestran señal de un efecto citopático durante 3 pasadas. Después de varias pasadas, es extraído ARN de los cultivos y probado para la presencia de ARN CRCV por RT-PCR.

Discusión

[0232] Este estudio informa de la detección de un coronavirus novedoso, CRCV, en perros con enfermedad respiratoria en perreras.

[0233] Se ha informado que los coronavirus causan enfermedad respiratoria de humanos, ganado bovino, porcino y aves de corral, pero su presencia en el tracto respiratorio de perros y una posible asociación con enfermedades

respiratorias caninas (ERIC) no ha sido determinada.

[0234] Fueron investigados perros de una perrera en que ERIC era endémica y no podía ser controlada por el uso de vacunas recomendadas contra ERIC. Muestras tomadas de el tracto respiratorio de esos perros fueron examinadas usando iniciadores RT-PCR dirigidos para el gen de polimerasa conservado de coronavirus (Stephensen *et al.*, 1999).

[0235] Inicialmente, siete muestras traqueales fueron encontradas positivas: la secuencia de los productos RT-PCR fue determinada y comparada con todas las secuencias de gen de polimerasa de coronavirus. Este análisis reveló que la secuencia ADNc obtenida a partir de las muestras caninas tenía la semejanza más elevada con el gen polimerasa de coronavirus bovino (98.8%) y un coronavirus humano OC43 (98.4%) pero únicamente una semejanza muy baja con el gen de polimerasa del coronavirus canino entérico (cepa 1-71, 68.53% similitud).

[0236] Un análisis filogenético fue realizado usando secuencias de polimerasa de once coronavirus adicionales. El coronavirus detectado en el tracto respiratorio de perros (CRCV) fue localizado en una rama común con tres virus de grupo 2: BCV, HCV cepa OC43 y HEV. Sin embargo, se mostró que el coronavirus entérico canino, un coronavirus de grupo 1, estaba únicamente relacionado de forma lejana.

[0237] El coronavirus respiratorio canino por tanto es un coronavirus novedoso de perros que está mas cercanamente relacionado con BCV y HCV-OC43, ambos conocidos por causar enfermedad respiratoria.

[0238] Para obtener más información de secuencia y para además determinar la relación con otros coronavirus que usan un gen más variable, una parte del gen Spike fue analizada. Ya que CRCV había sido mostrado ser más semejante con BCV y HCV-OC43, un alineamiento de las secuencias de sus genes Spike fue usado para diseñar un conjunto anidado de iniciadores. Fueron elegidos iniciadores anidados para conseguir una prueba más sensible.

[0239] La secuenciación de los productos de este RT-PCR confirmó la elevada similitud de CRCV con BCV y HCV-OC43.

[0240] La presencia de anticuerpos para CRCV fue analizada usando un ELISA basado en un antígeno BCV a causa de la elevada similitud de secuencia de los dos virus en el antígeno ADNc Spike. Los resultados de ELISA confirmaron la presencia de un virus similar a BCV en la población de estudio.

[0241] La prevalencia de anticuerpos fue del 30% en el momento de entrada en la perrera y 99% después de 21 días.

[0242] De forma interesante e inesperada, los análisis serológicos revelaron que perros con anticuerpos a CRCV en el día de entrada a la perrera desarrollaron enfermedad respiratoria menos frecuentemente que perros sin anticuerpos ($p < 0.001$). Por tanto la presencia de anticuerpos a CRCV tenía un efecto protector contra la enfermedad respiratoria en esta población.

[0243] Casi todos los perros negativos en el día de entrada a la perrera mostraron una suero conversión a CRCV dentro de las tres semanas, indicando que el virus es altamente contagioso. La serología usando un antígeno para coronavirus entérico canino (CECV) mostró una prevalencia mucho menor de anticuerpos a CECV en el día 21. Por tanto los resultados de BCV-ELISA no reflejaron una infección con coronavirus entérico canino y la reactividad cruzada entre los dos antígenos parece ser baja.

[0244] Anticuerpos de suero a CRCV estaban presentes en alrededor del 30% de perros de varios orígenes incluyendo perros entrando en una perrera de acogida así como perros domésticos. La presencia de CRCV no está por tanto limitada a la perrera investigada y el virus parece estar establecida en la población canina.

[0245] Por medio del PCR, fue detectado CRCV en tejido traqueal y de tejido de pulmón y por tanto parece infectar el tracto respiratorio superior e inferior de perros. Dentro de la población en perreras, CRCV-RNA fue detectado en el 27.3% de perros con todos los grados de enfermedad respiratoria así como en el 26.2% de perros que estaban aparentemente sanos en el momento de la eutanasia.

[0246] Se halló CRCV-RNA más frecuentemente en la tráquea de perros con tos leve (55%). Estudios usando la cepa de coronavirus humano 229E han mostrado, que coronavirus pueden causar disrupción de epitelio respiratorio y disquinesia ciliar (Chilvers *et al.*, 2001). Sin estar limitados por la teoría, creemos que una infección con CRCV tiene un efecto similar, y que el virus juega un papel importante en las etapas tempranas de la patogénesis de ERIC. Al dañar el epitelio respiratorio y romper la holgura ciliar CRCV facilita la entrada de otros patógenos virales o bacterianos. Por tanto mientras la infección de CRCV en sí misma puede causar solamente síntomas respiratorios leves, en conjunción con otros agentes patógenos podría llevar a enfermedad respiratoria severa.

[0247] La patogénesis de ERIC no ha sido investigada a fondo desde los años 70 cuando se determinó que *Bordetella bronchiseptica*, adenovirus canino de tipo 2 y parainfluenza canina eran las principales causas de la enfermedad. Sin embargo la vacunación de todos los perros contra CPIV, CAV-2 y virus de moquillo no ayudó a controlar la enfermedad en esta perrera a pesar de la evidencia de que la mayoría de los perros respondieron a la vacuna dentro de los 21 días (datos no mostrados).

[0248] Este estudio muestra una asociación de un coronavirus respiratorio canino novedoso con ERIC. La etiología de ERIC por tanto necesita ser reevaluada y el papel de microorganismos o microorganismos previamente no asociados con la enfermedad tiene que ser establecido.

Referencias

[0249]

Appel, M., and Binn L.N. (1987) Canine infectious tracheobronchitis, Short review: tos de perrera. En "Virus infections of carnivores" (M. Appel Ed.), 1st Edition, pp201-211 Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

Bemis, D.A., Carmichael, L.E., and Appel, M.J. (1977). Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.* 67, 282-93.

Binn, L.N., Alford, J. P., Marchwicki, R. H., Keefe, T.J., Beattie, R. J., and Wall, H.G. (1979). Studies of respiratory disease in random-source laboratory dogs: viral infections in unconditioned dogs. *Lab Anim Sci.* 29, 48-52

Binn, L. N., Eddy, G. A., Lazar, E. C., Helms, J., and Murnane, T. (1967). Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 126, 140-5

Chilvers, M. A., McKean, M., Rutman, A., Myint, B. S., Silverman, M., and O'Callaghan, C. (2001). The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J.* 18, 965-70.

Ditchfield, J., Macpherson, L. W., and Zbitnew, A. (1962). Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an

outbreak of laryngotracheitis ("kennel, cough"). Can. Vet. Jour. 3, 238-247

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2c). Cladistics 5, 164-166

Ignjatovic, J., and Sapats, S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. Rev Sci Tech. 19, 493-508.

Karpas, A., King, N.W., Garcia, F.G., Calvo, F., and Cross, R.E. (1968). Canine tracheobronchitis: Isolation and characterization of the agent with experimental reproduction of the disease. Proc Soc Exp Biol Med. 127, 45-52.

Keil, D.J., and Fenwick, B. (1998). Role of Bordetella bronchiseptica in infectious tracheobronchitis in dogs. J Am Vet Med Assoc. 15, 200-7.

Lou, T.Y., and Wenner, H.A. (1963). Natural and experimental infection of dogs with reovirus, type1: pathogenicity of the strain for other animals. Am.J.Hyg. 77, 293-304.

Makela, M.J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimaki, M., Blomqvist, S., Hyypia, T., Arstila, P. (1998). Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. J Clin Microbiol. 36, 539-42.

Page, R.D.M. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 1996 12: 357-358

Pearson WR. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. Methods Enzymol. 1990;183: 63-98.

Pensaert M, Callebaut P, Vergote J. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. Vet Q. 1986 Jul;8(3):257-61.

Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. Am J Vet Res. 1993 Mar;54(3):387-91.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronavirus: structure and genome expression. J Gen Virol. 1988 Dec; 69 (Pt 12):2939-52. Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronavirus and development of a consensus polymerase chain reaction assay. Virus Res. 1999 Apr;60(2):181-9.

Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytosolic viruses, and Pasteurella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. J Am Vet Med Assoc. 2000 May 15;216(10):1599-604.

Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. Vet Rec. 1993 Jan 2;132(1):7-11.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG The Clusta1X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997 Dec 15;25(24):4876-82.

Example 2: Cloning and expression of CRCV Spike

[0250] El gen Spike de CRCV fue clonado usando los iniciadores listados en la Tabla 5 y usando la siguiente estrategia de clonación, que es ilustrada en la Figura 18.

1. El gen Spike fue amplificado en cuatro fragmentos solapados (A,B,C,D).

2. El producto PCR Sp5-Sp2 (B) fue unido al producto Sp1-Sp8 (C) usando el sitio *PvuII* en el solapamiento.

3. Este fragmento fue clonado en el vector pT7blue2 (Novagen) usando los sitios de restricción *NcoI* y *BstXI*

4. El fragmento de PCR SpFXho-Sp6 (A) fue unido a BC usando el sitio de restricción *BstXI* en el solapamiento y el sitio *XhoI* que había sido incorporado en el iniciador SpF-Xho.

5. El fragmento ABC fue movido dentro del vector de transferencia de baculovirus pMelBacB (Invitrogen) usando los sitios de restricción *XhoI* y *NcoI*.

6. El fragmento de PCR Sp7-SpR-HisTag- Eco (D) fue unido a ABC usando el sitio de restricción *NcoI* en el solapamiento y el sitio *EcoRI* que había sido incorporado dentro del iniciador SpR-Eco-HisTag resultando en el gen Spike completo en pMelBacB (Spike MelBac). Este constructo contiene un HisTag (6xHis) en el extremo C terminus de la proteína expresada.

7. Para la expresión mamífera el gen completo fue movido a pSecTagA (Invitrogen) usando el sitio *BamHI* en pMelBacB y el sitio *EcoRI* al final de ABCD resultando en el plásmido SpikeSecTag.

Construcción de un baculovirus recombinante

[0251] Una cotransfección fue realizada en células Sf9 usando el ADN de baculovirus de Bac-N-Blue (Invitrogen) y Spike MelBac. Se mostró que el baculovirus resultante (AcSpCRCV 1-11) contenía un inserto de extensión completa por iniciadores usando PCR (Invitrogen) situados corriente arriba y corriente debajo del sitio de recombinación.

Expresión en células mamíferas

[0252] El plásmido Spike SecTag fue transfectado dentro de células BHK-21 usando Lipofectamine (Invitrogen). La expresión de la proteína Spike fue analizada usando una muestra de suero procedente de un perro que se había mostrado positivo para anticuerpos a CRCV usando ELISA (antígeno BCV obtenido de Churchill) y un suero de control positivo para BCV obtenido de Churchill (pollo anti BCV). Las células transfectadas mostraron una señal positiva en una prueba de inmunofluorescencia usando suero canino o de pollo y un conjugado etiquetado de FITC (IgG anti-perro FITC o IgG anti pollo FITC)

Nombre	Secuencia	Localización en BCV
Sp 1	5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT	1637-1660
Sp 2	5'-CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG	2258-2236
Sp 3	5'-GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-TG	1666-1686
Sp 4	5'-GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAG-AG	2107-2088
Sp 5	5'-AAC-GGT-TAC-ACT-GTT-CAG-CC	931-950
Sp 6	5'-CAA-GTA-AAT-GAG-TCT-GCC-TG	1121-1102
Sp 7	5'-GGC-TGC-CAC-CTC-TGC-TAG-TC	2919-2938
Sp 8	AA 5'-ATT-GTT-AAA-TGC-ATT-AGC-AAT-AAG- C	3069-3045
SpF	5'-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	4-29
SpR	5'-GTC-GTC-ATG-TGA-WGT-TTT-RAT-TAC	4089-4066
SpF-XhoI	5'-AGC-TCG-AGC-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	
SpR His-coRI	5'-TTG-AAT-TCT-TAA-TGA-TGA-TGA-TGA-TGG-TCG-TCA-TGT-GAW-GTT-TTR-ATT-AC	
SpF-XhoI contiene un sitio Xho I (negrita). SpR-His-EcoRI contiene un 6xHisTag (subrayado doble), un codón de parada (subrayado) y un EcoRI sitio (negrita)		

Nombre	Secuencia	Localización en BCV
Sp 1	5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT	1637-1660
Sp 2	5'-CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG	2258-2236
Sp 3	5'-GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-TG	1666-1686
Sp 4	5'-GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAG-AG	2107-2088
Sp 5	5'-AAC-GGT-TAC-ACT-GTT-CAG-CC	931-950
Sp 6	5'-CAA-GTA-AAT-GAG-TCT-GCC-TG	1121-1102
Sp 7	5'-GGC-TGC-CAC-CTC-TGC-TAG-TC	2919-2938
Sp 8	AA 5'-ATT-GTT-AAA-TGC-ATT-AGC-AAT-AAG- C	3069-3045
SpF	5'-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	4-29
SpR	5'-GTC-GTC-ATG-TGA-WGT-TTT-RAT-TAC	4089-4066
SpF-XhoI	5'-AGC-TCG-AGC-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	
SpR His-coRI	5'-TTG-AAT-TCT-TAA-TGA-TGA-TGA-TGA-TGG-TCG-TCA-TGT-GAW-GTT-TTR-ATT-AC	
SpF-XhoI contiene un sitio Xho I (negrita). SpR-His-EcoRI contiene un 6xHisTag (subrayado doble), un codón de parada (subrayado) y un EcoRI sitio (negrita)		

Reivindicaciones

1. Una composición de vacuna para vacunar perros, la composición comprendiendo:
un coronavirus respiratorio canino (CRCV) que comprende una proteína Spike (S) teniendo la secuencia aminoácida listada en la Figura 4, o
una proteína S coronaviral teniendo al menos 97% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4, o un fragmento inmunogénico de la Figura 4 de al menos 200 aminoácidos longitud, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína S coronaviral o dicho fragmento inmunogénico de la Figura 4.
2. Una composición de vacuna según la Reivindicación 1 en la que la proteína S coronaviral tiene al menos 98% de identidad con la secuencia aminoácida de la Figura 4.
3. Una composición de vacuna según la Reivindicación 2 en la que la proteína S coronaviral tiene al menos 99% de identidad con la secuencia aminoácida de la Figura 4.
4. Una composición de vacuna según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3 en donde la proteína S coronaviral es una proteína aislada o recombinante.
5. Una composición de vacuna según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 y también comprendiendo un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
6. Una composición de vacuna según cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, además comprendiendo uno cualquiera o más de:
un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra el virus parainfluenza canino;
un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra el tipo 2 de virus adeno canino;
un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra virus de herpes canino; y
un agente capaz de aumentar una respuesta inmune en un perro contra *Bordetella bronchiseptica*.
7. Una proteína S de coronavirus teniendo al menos 97% de identidad de secuencia aminoácida con la secuencia listada en la Figura 4 para uso en medicina.
8. Una proteína S de coronavirus para uso según la Reivindicación 7 que es una proteína recombinante o aislada.
9. Uso de un coronavirus que tiene una proteína S con al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4 o una proteína S coronaviral teniendo al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4 o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína S coronaviral o dicho fragmento inmunogénico de la misma, en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmune contra el coronavirus respiratorio canino en un perro.
10. El uso de un coronavirus teniendo una proteína S con al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4 o una proteína S coronaviral teniendo al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína S coronaviral o dicho fragmento inmunogénico de la misma, en la preparación de un medicamento para profilaxis de enfermedad respiratoria en un perro.
11. El uso según la Reivindicación 9 o 10 en donde el coronavirus comprende una proteína S teniendo al menos 95% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4.
12. El uso según la Reivindicación 11 en donde el coronavirus es CRCV que comprende una proteína S teniendo la secuencia aminoácida de la Fig. 4.
13. El uso según la Reivindicación 9 o 10 en donde la proteína S coronaviral tiene al menos 95% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4.
14. El uso según la Reivindicación 13 en donde la proteína S coronaviral tiene al menos 97% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Fig. 4.
15. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 9-10 y 13-14 en donde la proteína S coronaviral comprende al menos uno de V en la posición 103; V en la posición 118; D en la posición 166; M en la posición 171; K en la posición 179; P en la posición 192; S en la posición 210; H en la posición 235; F en la posición 267; F en la posición 388; M en la posición 407; S en la posición 436; I en la posición 440; I en la posición 447; F en la posición 501; Y en la posición 525; N en la posición 528; L en la posición 540; K en la posición 582; G en la posición 608; G en la posición 692; S en la posición 695; W en la posición 757; G en la posición 758; Q en la posición 763; T en la posición 769; P en la posición 786; H en la posición 792; R en la posición 818; P en la posición 827; V en la posición 828; F en la posición 887; D en la posición 933; F en la posición 977; T en la posición 1011; S en la posición 1018; K en la posición 1063; L en la posición 1256; y M en la posición 1257.
16. El uso según cualquiera de las Reivindicaciones 9-10 y 13-15 en donde la proteína S coronaviral comprende la secuencia aminoácida de la Figura 4.
17. El uso según las Reivindicaciones 9-10 y 13-16 en donde la proteína S coronaviral es una proteína aislada o recombinante.
18. Una composición de vacuna según cualquiera de las Reivindicaciones 1, 5 o 6, en donde el coronavirus ha sido atenuado o inactivado.
19. Un uso según cualquiera de las Reivindicaciones 9-12, en donde el coronavirus ha sido atenuado o inactivado.
20. Una composición comprendiendo un coronavirus que tiene una proteína S con al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4, o una proteína S coronaviral teniendo al menos 90% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína S coronaviral o dicho fragmento inmunogénico de la misma, para uso para estimular una respuesta inmune contra el coronavirus respiratorio canino en un perro, o para uso en profilaxis de enfermedad respiratoria en un perro.
21. Una composición para uso según la Reivindicación 20 en donde el coronavirus comprende una proteína S teniendo al menos 95% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4.
22. Una composición para uso según la Reivindicación 21 en donde el coronavirus es CRCV que comprende una proteína S que tiene la secuencia aminoácida de la Figura 4.
23. Una composición para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 20-22 en donde el coronavirus ha sido atenuado o inactivado.

ES 2 384 445 T3

24. Una composición para uso según la Reivindicación 20 en donde la proteína coronaviral tiene al menos 95% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4.
25. Una composición para uso según la Reivindicación 24 en donde la proteína S coronaviral tiene al menos 97% de identidad aminoácida con la secuencia aminoácida de la Figura 4.
26. Una composición para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 20, 24 y 25 en donde la proteína S coronaviral comprende al menos uno de V en la posición 103; V en la posición 118; D en la posición 166; M en la posición 171; K en la posición 179; P en la posición 192; S en la posición 210; H en la posición 235; F en la posición 267; F en la posición 388; M en la posición 407; S en la posición 436; I en la posición 440; I en la posición 447; F en la posición 501; Y en la posición 525; N en la posición 528; L en la posición 540; K en la posición 582; G en la posición 608; G en la posición 692; S en la posición 695; W en la posición 757; G en la posición 758; Q en la posición 763; T en la posición 769; P en la posición 786; H en la posición 792; R en la posición 818; P en la posición 827; V en la posición 828; F en la posición 887; D en la posición 933; F en la posición 977; T en la posición 1011; S en la posición 1018; K en la posición 1063; L en la posición 1256; y M en la posición 1257.
27. Una composición para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 20 y 24-26 en donde la proteína S coronaviral comprende la secuencia aminoácida de la Figura 4.
28. Una composición para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 20 y 24-27 en donde la proteína S coronaviral es una proteína aislada o recombinante.

FIGURA 1 

```
ctcagatgaa ttgaaatat gctattagtg ctaagaatag agcccgact gttgctggtg 60
ttccatact tagtactatg actggcagaa tgttcatca aaaatgttg aaaagtatag 120
cagctacacg tgggtgttct gttgttatag gcaccactaa attttatggc ggctgggatg 180
atatgttacg tcgccttatt aaagatgttg acaatcctgt acttatgggt tgggattatc 240
ctaagtgtga 250
```

FIGURA 2

```
QMNLKYAISA KNRARTVAGV SILSTMTGRM FHQKCLKSIA ATRGVPVIG TTKFYGGWDD 60
MLRRLIKDVE NPVLMGWDYP KCE 84
```

FIGURA 3 (Página 1 de 2)

atgtttttga	tacttttaaat	ttccttacca	atggcttttg	ctgttatagg	agatttaaag	60
tgtactacgg	tttccatcaa	tgatgttgac	accggtgctc	cttctattag	cactgatgtt	120
gtcgatgtta	ctaattggtt	aggtacttat	tatgttttag	atcgtgtgta	tttaaatact	180
acattgttgc	ttaattggtta	ttatcctact	tcaggttcta	catatcgtaa	tatggcactg	240
aagggaactt	tactattgag	cacactatgg	tttaaaccac	catttccttc	tgattttatt	300
gatggtgttt	ttgctaaggt	aaaaaatacc	aagggtatta	aagatggtgt	agtgtatagt	360
gagtttcctg	ctataactat	aggtagtact	tttgtaaata	catcctatag	tgtggtagta	420
caaccacata	ctactaat	agataataaa	ttacaaggtc	tcttagagat	ctctgtttgc	480
cagtatacta	tgtgcgatta	cccacatacg	atgtgtcatc	ctaactctggg	taataaacgc	540
atagaactat	ggcattggga	tacaggtgtt	gttccctgtt	tatataagcg	taatttcaca	600
tatgatgtga	atgctgatta	tttgtattcc	catttttctc	aagaagggtg	tactttttat	660
gcatatttta	cagacactgg	tggtgttact	aagtttctgt	ttcatgttta	tttaggcacg	720
gtgctttcac	attattatgt	catgcccttg	acttgtaata	gtgctatgac	tttagaatac	780
tgggttacac	ctctcacttt	taaacaatat	ttactcgctt	tcaatcaaga	tgggtgttatt	840
tttaatgctg	ttgattgtaa	gagtgtttt	atgagtgaga	ttaagtgtaa	aacactatct	900
atagcaccat	ctactggtgt	ttatgaatta	aacggttaca	ctgttcagcc	aattgcagat	960
gtttaccgac	gtatacctaa	tcttcccgat	tgtaatatag	aggcttggct	taatgataag	1020
tcggtgcctt	ctccattaaa	ttgggaacgt	aagacctttt	caaattgtaa	ttttaatatg	1080
agcagectga	tgtcttttat	ccaggctgac	tcgtttactt	gtaataatat	tgatgctgct	1140
aagatatagc	gtatgtgttt	tttcagcata	actatagata	agtttgctat	acccaatggt	1200
aggaagggtg	acctacaaat	gggcaatttg	ggctatttgc	agtcttttaa	ctatagaatt	1260
gatactactg	ctacaagttg	tcagttgtat	tataatttac	ctgctagtaa	tgtttctatt	1320
agcagggtta	atccttctat	ttggaatagg	agatttggtt	ttacagaaca	atctgttttt	1380
aagcctcaac	ctgtagggtg	ttttactgat	catgatgttg	tttatgcaca	acattgtttt	1440
aaagctccca	caaatttctg	tccgtgtaaa	ttgaatgggt	ctttgtgtgt	aggtagtggg	1500
tttggtatag	atgctggtta	taaaaatagt	ggatataggca	cttgtcctgc	aggtactaat	1560
tatttaactt	gttataatgc	taaccaatgt	gattgtttgt	gcactccaga	ccctatttta	1620
tctaaatcta	cagggcctta	taagtcccc	caaactaaat	acttagttgg	cataggtgag	1680
cactgttctg	gtcttgctat	taaaagtgat	tattgtggag	gcaatccttg	tacttgccaa	1740
ccaaaagcat	ttttgggttg	gtctgtggac	tcttgtttac	aaggggatag	gtgtaatatt	1800
tttgctaatt	ttattttgca	tgggtttaat	agtggtaacta	cttgttctac	tgattttacaa	1860
aatcaaac	cagacataat	tcttggtgtt	tgtgttaatt	atgatcttta	tggtattaca	1920
ggccaaggta	tttttgttga	ggtaaatgcg	acttattata	atagttggca	gaacctttta	1980
tatgattcta	atggtaatct	ctatggtttt	agggactact	taacaaacag	aacttttatg	2040
attcgtagtt	gctatagcgg	tcgtgtttca	gcgggctttc	actctaactc	ttccgaacca	2100
gcattgctat	ttcggaatat	taaatgcaat	tacgttttta	ataatactct	ttcacgacag	2160
ctgcaacct	ttaactattt	tgatagttat	cttggttgtg	ttgtcaatgc	tgataatagt	2220

FIGURA 3 (Página 2 de 2)

acttctagtt	ctgttcaaac	atgtgatctc	acagtaggta	gtggttactg	gggggattac	2280
tctacacaaa	gacgaagtcg	tagaacgatt	accactgggt	atcggtttac	taattttgag	2340
ccattttactg	ttaatccagt	aatgatagtt	ttacaccctg	taggtgggtt	gtatgaaatt	2400
caaatacctt	cagagtttac	tataggtaat	atggaggagt	ttattcaaac	aagatctcct	2460
aaagttacta	ttgattgtcc	tgtttttgtc	tgtggtgatt	atgcagcatg	taaatcacag	2520
ttggttgaat	atggtagttt	ttgtgacaat	attaatgcta	tactcacaga	agtaaatgaa	2580
ctacttgaca	ctacacagtt	gcaagtagct	aatagtttaa	tgaatgggtg	cactcttagc	2640
actaagctta	aagatggctt	taatttcaat	gtagatgaca	tcaatttttc	ccctgtatta	2700
ggttggttag	gaagcgaatg	taataaagtt	tccagtagat	ctgctataga	ggattttactt	2760
ttttctaaag	taaagttatc	tgatgttggt	tttgttgatg	cttataataa	ttgtactgga	2820
ggtgcgaaa	ttagggacct	catttggtgtg	caaagttata	atggtatcaa	agtgttgctt	2880
ccactgctct	cagaaaatca	gatcagtggg	tacactttgg	ctgccacctt	tgctagtctg	2940
tttctctcct	ggtcagcagc	agcaggcgta	ccattttatt	taaatgttca	gtatcgtatt	3000
aatggatttg	gtgttaccat	ggatgtgcta	actcaaaatc	aaaagcttat	ttctaattgca	3060
tttaacaatg	cccttgatgc	tattcaggaa	gggtttgatg	ctaccaattc	tgcttttagtt	3120
aaaattcaag	ctgttggtta	tgcaaatgct	gaagctctta	ataacttatt	gcaacaactc	3180
tctaataaat	ttggtgctat	aagtgttctt	ttacaagaaa	ttctatctag	acttgatgct	3240
cttgaagcgc	aagctcagat	agacagactt	atcaatgggc	gtcttaccgc	tcttaattgct	3300
tatgtttctc	aacagcttag	tgattctaca	ctagtaaaat	ttagtgagc	acaagctatg	3360
gagaagggtta	atgaatgtgt	caaaagccaa	tcatctagga	taaatttttg	tggtaatggg	3420
aatcatatta	tatcattagt	gcagaatgct	ccatatgggt	tgtattttat	ccactttagc	3480
tatgtcccta	ctaagtatgt	cactgcgaag	gtagtcccg	gtctgtgcat	ygcaggtgat	3540
agaggatag	ctcctaagag	tggttatttt	gttaatgtaa	ataaacttg	gatgttcaact	3600
ggtagtggtt	attactacct	tgaacctata	actggaaata	atgtggttgt	tatgagtacc	3660
tgtgctgtta	actatactaa	agcaccggat	gtaatgctga	acatttcaac	acccaacctc	3720
cctgatttta	aggaagagtt	ggatcaatgg	tttaaaaacc	aaacattaat	ggcaccagat	3780
ttgtcacttg	attatataaa	tgttacattc	ttggacctac	aagatgaaat	gaatagggtta	3840
caggaggcaa	taaaagtttt	aatcatagc	tacatcaatc	tcaaggacat	tggtacatat	3900
gaatattatg	taaaatggcc	ttggtatgta	tggtttttta	ttggccttgc	tggtcgtagct	3960
atgcttggtt	tactattctt	catatgctgt	tgtacaggat	gtgggactag	ttgttttaag	4020
aaatgcggtg	gttggtgtga	tgattatact	ggacatcagg	agtttagtaat	caaaacgtca	4080
catgacgact	aa					4092

FIGURA 4

MFLILLISLP	MAFAVIGDLK	CTTVSINDVD	TGAPSISTDV	VDVTNGLGTY	YVLDRVYLNT	60
TLLNGYYPT	SGSTYRNMAL	KGTLLLSTLW	FKPPFLSDFI	DGVFAKVKNT	KVIKDGVVYS	120
EFPAITIGST	FVNTSYSVVV	QPHTTNLDNK	LQGLLEISVC	QYTMCDYPHT	MCHPNLGNKR	180
IELWHWDTG	VPCLYKRNFT	YDVNADYLYS	HFYQEGGTFY	AYFTDTGVVT	KFLFHVYLG	240
VLSHYYVMPL	TCNSAMTLEY	WVTPLTFKQY	LLAFNQDGI	FNAVDCKSDF	MSEIKCKTLS	300
IAPSTGVYEL	NGYTVQPIAD	VYRRIPNLPD	CNIEAWLNDK	SVPSPLNWER	KTFSNCFNM	360
SSLMSFIQAD	SFTCNNIDAA	KIYGMCFFSI	TIDKFAIPNG	RKVDLQMGNL	GYLQSFNYRI	420
DTTATSCQLY	YNLPASNVSI	SRFNPSIWN	RFGTEQSVF	KPQPGVFTD	HDVVYAQHCF	480
KAPTNFCPCK	LNGSLCVGSG	FGIDAGYKNS	GIGTCPAGTN	YLTCYNANQC	DCLCTPDPIL	540
SKSTGPYKCP	QTKYLVGIGE	HCSGLAIKSD	YCGGNPCTCQ	PKAFLGWSVD	SCLQGDRCNI	600
FANFILHGVN	SGTTCSTDLQ	KSNTDIILGV	CVNYDLYGIT	GQGIFVEVNA	TYNSWQNL	660
YDSNGNLYGF	RDYLTNRTFM	IRSCYSGRVS	AGFHSNSSEP	ALLFRNIKCN	YVFNNLTLSRQ	720
LQPINYFDSY	LGCVVNADNS	TSSSVQTCDL	TVGSGYWGDY	STQRRSRRTI	TTGYRFTNFE	780
PFTVNPVND	LHPVGGLYEI	QIPSEFTIGN	MEEFIQTRSP	KVTIDCPVFE	CGDYAACKSQ	840
LVEYGSFCDN	INAILTEVNE	LLDTTQLQVA	NSLMNGVTLS	TKLKDGFNFN	VDDINFSPVL	900
GCLGSECNKV	SSRSAIEDLL	FSKVKLSDVG	FVDAYNNCTG	GAEIRDLICV	QSYNGIKVLP	960
PLLSENQISG	YTLAATFASL	FPPWSAAAGV	PFFLVNQYRI	NGIGVTMDVL	TQNQKLISNA	1020
FNNALDAIQE	GFDATNSALV	KIQAVVNANA	EALNNLLQQL	SNKFGAISAS	LQEILSRDLA	1080
LEAQAQIDRL	INGRLTALNA	YVSQQLSDST	LVKFSAQAAM	EKVNECVKSQ	SSRINFCGNG	1140
NHIISLVQNA	PYGLYFIHFS	YVPTKYVTAK	VSPGLCIAGD	RGIAPKSGYF	VNVNNTWMFT	1200
GSGYYYPEPI	TGNNVVVMST	CAVNYTKAPD	VMLNISTPNL	PDFKEELDQW	FKNQTLMAPD	1260
LSLDYINVTF	LDLQDEMNR	QEAIKVLNHS	YINLKDIGTY	EYYVKWPWYV	WLLIGLAGVA	1320
MLVLLFFICC	CTGCGTSCFK	KCGGCCDDYT	GHQELVIKTS	HDD		1363

FIGURA 5

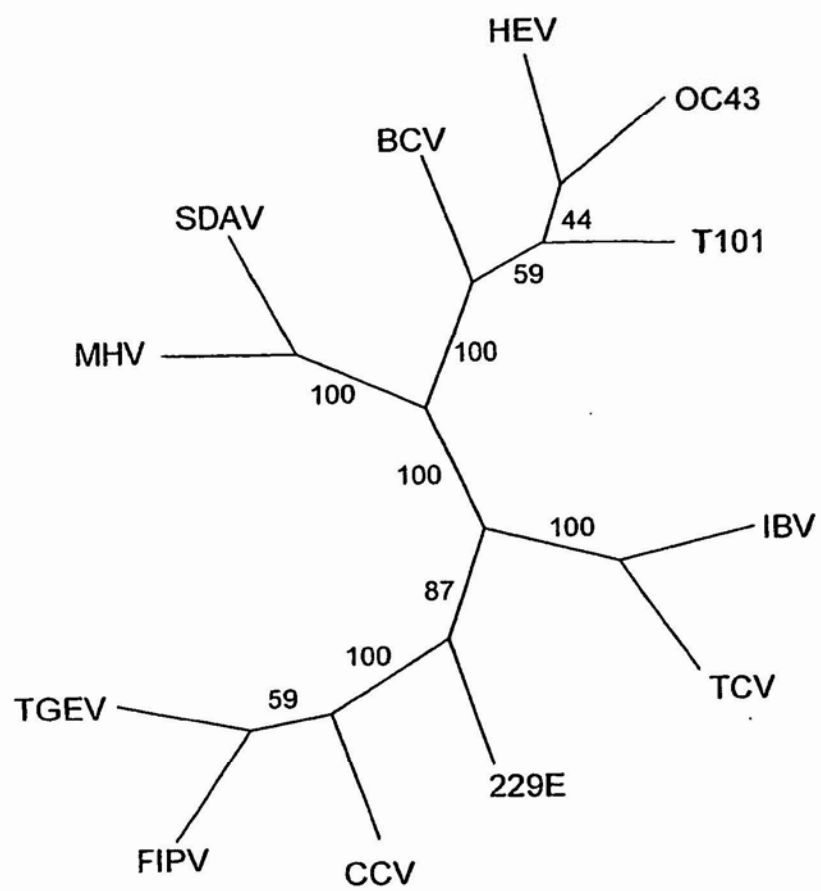


FIGURA 6

```

T101 CTCAGATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
BCV  CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
OC43 CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
HEV  CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCCAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
CCV  CTCAGATGAATTTGAAATATGCTATTTCTGGAAAGGCTAGAGCTCGTACAGTAGGAGGAG
      ***** ** *** ***** ** ** * ** *

T101 TTTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAAAGTATAG
BCV  TTTCCATACTCAGTACTATGACTGGCAGAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAAAGTATAG
OC43 TTTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAAAGTATAG
HEV  TTTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAATGTTTCATCAAAAATGCTTGAAAAGTATAG
CCV  TTTCACTTCTTTCTACCATGACTACGAGACAATACCACCAGAAGCATTGGAAGTCAATTG
      **** * ** *** ***** *** * ** ** ** ***** ** *

T101 CAGCTACACGTGGTGTTCTGTTGTTATAGGCACCCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG
BCV  CAGCTACACGTGGTGTTCTGTTGTTATAGGCACCCTAAGTTTATGGCGGCTGGGATG
OC43 CAGCTACACGTGGTGTTCTGTTGTTATAGGCACCCTAAATTTTATGGTGCTGGGATG
HEV  CAGCTACACGTGGCGTTCCTGTGGTTATAGGCACCCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG
CCV  CTGCAACACGCAATGCCACTGTGGTTATTGGCTCAACCAAGTTTATGGTGTTGGGATA
      * ** ***** * ***** ***** *** * ** ** ***** ** *****

T101 ATATGTTACGTCGCCTTATTAAAGATGTTGACAATCCTGTACTTATGGGTTGGGATTATC
BCV  ATATGTTACGTCGCCTTATTAAAGATGTTGATAATCCTGTACTTATGGGTTGGGATTATC
OC43 ATATGTTACGCCGCCTTATTAAAGATGTTGACAATCCTGTACTTATGGGTTGGGATTATC
HEV  ATATGTTACGCCGCCTTATTAAAGATGTTGATAATCCTGTACTTATGGGTTGGGATTATC
CCV  ACATGCTTAAAAATTTAATGCGTGATGTTGATAATGTTGTTGATGGGATGGGACTATC
      * *** * * ** ***** *** * * ***** ***** *****

T101 CTAAGTGTGA
BCV  CTAAGTGTGA
OC43 CTAAGTGTGA
HEV  CAAAGTGTGA
CCV  CTAAGTGTGA
      * *****

```

FIGURA 7

prothCVpoly	---MNLKYAISAKNRARTVAGVSILSTMTGRMFHQKCLKSIAATR
prothEVpoly	---MNLKYAISAKNRARTVAGVSILSTMTGRMFHQKCLKSIAATR
protBCVpoly	---MNLKYAISAKNRARTVAGVSILSTMTGRMFHQKCLKSIAATR
protCRCVpol	--QMNLKYAISAKNRARTVAGVSILSTMTGRMFHQKCLKSIAATR
protCECVpol	MTQMNLKYAISGKARARTVGGVSLSTMTTRQYHQHLKSIAATR
	*****.* *****.***:***** * :*** *****
prothCVpoly	GVPVVGTTKFYGGWDDMLRRLIKDVDNPVLMGWDYPKC
prothEVpoly	GVPVVGTTKFYGGWDDMLRRLIKDVDNPVLMGWDYPKC
protBCVpoly	GVPVVGTTKFYGGWDDMLRRLIKDVDNPVLMGWDYPKC
protCRCVpol	GVPVVGTTKFYGGWDDMLRRLIKDVENPVLMGWDYPKC--
protCECVpol	NATVVIGSTKFYGGWDDNMLKNLMRDVDNGCLMGWDYPKC---
	...*****:*****:***:.*:*:***:*****

FIGURA 8 (Página 1 de 9)

CRCVspike	-----ATGTTTTTGATACTTTTA-----ATTTCCTTACCAATG
CECVspike	ATGATTGTGCTCGTAACTTGCATTTTATTGTTATGTTTCATACCACACTGCTTCGAGTACG
	* * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	GCTTTTGCTG-TTATAGGAGATTTAAAGTGACTACGGTTTC-CATCAATGATGTTGACA
CECVspike	TCAAATAATGATTGTAGACAAGTTAA--CGTAACACAATTAGATGGCAATGAAAACCTCA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	CCGGTG-CTCCTTCTATTAGCACTGATGTTGTCGATGTTACTAATGGTTTAGGTACTTAT
CECVspike	TTAGAGACTTTTTGTTTCAAACTT-TAAAGAAGAAGGAACTGTAGTTGTTGGTGGTTAC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TATGTTTTAGA----TCGTGTG--TATTTAAATACTACA----TGTTGCTTAATGGTTA
CECVspike	TACCCTACAGAGGTTTGGTATAACTGTTCTAGAACAGCAACAACACTACTGCCTA-TGAGTA
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TTATCCTACTTCAGGTTCTACATATCGTAATATGGCA-CTGAAGGGAACTTTACTATTGA
CECVspike	TTTCAGTAATATACACGCATTCTATTTTGATATGGAAGCCATGGAGAATAGTACTGGTAA
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	-GCACACTATGG-TTTAAACCACCATTCTTTCTGATTTTATTGATGGTGTGTTTTGCTAA
CECVspike	TGCACGTGGTAAACCTTTATTATTTTCATGTTTCATGGTGAGCCTGTTAGTGTCATCATATA
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	GGTAAAAAATACCAAGGTTATTAAAGATGGTGTAGTGATAG---TGAGTTTCCTGCTAT
CECVspike	CATATCTTATAGAGATGATGTGCAACATAGGCCACTTTTAAAACACGGATTAGTGTGCAT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	AACTATAGGTAGTACTTTTG--TA-AATACATCCTATAGTGTTGGTAGTACAACCACATAC
CECVspike	AACTGAAAGTCGCAACATTGACTATAACAGTTTCACCAGTA-GCCAGTGGAATTCCATAT
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	-TACTAATTTAGATAATAAATTACAAGGTCTCTTAGAGATCTCTGTTTGCCAGTATACTA
CECVspike	GTACGGGTAATGACAGAAAAATTCCTT-TCTCTGTCATACCCACGGACAATGGAACAAAA
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

FIGURA 8 (Página 2 de 9)

CRCVspike	-TGTGCGATTACCCACATA-CGATGTGTC-ATCCTAATCTGGGT-AATAAACG--CATAG
CECVspike	ATTTATGGTCTTGAGTGGAATGATGAATTTGTTACAGCGTACATTAGTGGTCGTTCTTAT
	* * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	AACTATGGCATTGGGATACAGGTGTTGTTCCCTGTT-TATATAAGCGTAATTTACATAT
CECVspike	AATTGGAACATCAATAATAATTGGTTTAAACAATGTCACGCTTCTGTATAGTCGCTCAAGC
	** * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	GATGTGA-ATGCTGATTATTTGTATTCCCATTTTTATCAAGAAGGTGGTACTTT--TTA
CECVspike	ACTGCCACATGGCAACACAGTGC-TGCATACGTTTACCAAGGTGTTTCTAACTTCACTTA
	** * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TGCATATTTTACAGACACTGGTGTGTTACTAAGTTTCTGTTTCATGTTTAT-TTAGGCA
CECVspike	TTACAAGTTAAATAACACCAATGGTCTAA--AAACCTATGAATTATGTGAAGATTATGAA
	* * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	CGGTGCTTT--CACATTATTA-TGTCATGCCCTTGACTTGTAATAGTGCTATGACTTTA
CECVspike	TATTGCACTGGCTACGCCACTAACATCTTTGCCCCAACTGTGGGAGGTTACATACCTGAT
	*** * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	GAATACTGGGTTA-----CACCTCTCACTTTTAAACAATATTTACTCGCTTTCAATCAAG
CECVspike	GGATTTAGTTTTTAAACAATTGGTTTTTGTCTACAAACAGCTCCACTTTTGTAGTGGCAGA
	* * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	ATGGTGTATTATTTAATGCTGTTGATTGTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAGTGT-
CECVspike	TTTGTAACAAATCAACCATTATTAGTTAATTGCTTGTGGCCAGTTCCTAGTTTTGGTGT
	* * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	--AAAACACTATCTATAGCACCATCTACTGGTGTATGAATTAAACGGTTACACTGTTC
CECVspike	GCAGCACAAGAATTTTGTGTTTGAAGGTGCACAGTTTAGCCAATGTAATGGTGTGTTTTTA
	* * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	AGCCA-ATTGCAGATGTTTACCGACGTATACCTAATCTTCCCG--ATTGTAATATAGAGG
CECVspike	AATAACACAGTAGATGTCATTAGATTCAACCTTAATTTTACTGCAGATGTACAATCTGGC
	* * * * * * * * * * * * * * *

FIGURA 8 (Página 3 de 9)

CRCVspike	CTTGGCTTAATGATAAGT-CGGTGCCTTCTCCATTAAATTGGGAACGTAAGACCTTTTCA
CECVspike	ATGGGTGCTACAGTATTTTCACTGAATACAACAGGTGGTTGCATTCTTGAGATTTCTT--
	* *
CRCVspike	AATTGTAATTTTAATATGAGCAGCCTGATGTCTTTTATCCAGGCTGACTCGTTTACTTGT
CECVspike	-GTTATAATGATATAGTGAGCGAGTCAAGTTTCTACAGTTATGGTGA---AATTCCTTC
	* *
CRCVspike	AATAATATTGATGCTGCTAAGATATACGGTATGTGTTTTTTTCA--GCATAACTATAGATA
CECVspike	GGCGTAACTGATGG-ACCGCGTTAT-TGTTATGTCCTCTATAATGGCACAGCTCTTAAGT
	* *
CRCVspike	AGTTTGCTA---TACCCAATGGTAGGAAGGTTGACCTACAAATGGGCAATTTGGGCTATT
CECVspike	ATTTGCGGCACATTACCCCTAGTGTCAAGG--AAATTGCTATTAG-TAAGTGGGGCCAAT
	* *
CRCVspike	TGCAGTCTTTTAACTATAGAATTGATACTACTGCTACAAGTTGTCAGTTGTATTATAATT
CECVspike	TTTATATTAATGGTTACAATTTCTTTAGCACTTTTCTTATTGATTGTATATCTTTTAACT
	* *
CRCVspike	TACCTGCTAGTAATGTTTCTATTAGCAGGTTTAATCCTTCTATTTGGAATA--GGAGATT
CECVspike	TAACCACTGGTGATAGTGGAGCATTTTGGACAATTGCTTACACATCGTACACTGAAGCAT
	* *
CRCVspike	TGGTTTTTA-CAGAACAATCTGTTTTTAAGCCT-CAACCTGTAGGTGTTTTTACTGATCAT
CECVspike	TAGTACAAGTTGAAAACACAGCCATTAAAAAGGTGACGTATTGTAACAGTCAC-ATTAAT
	* *
CRCVspike	GATGTTGTTTATGCACAACATTGTTTTAAAGCTCCCAAAATTTCTGTCCG-----TGTA
CECVspike	AACATCAAATGTTCTCACTTACTGCTAATTTGCAAAATGGCTTTTATCCTGTTGCTTCA
	* *
CRCVspike	AATTGAATGGGTCTTTGTGTGTAGGTAGTGGTTTTGGTA--TAGATGCTGGTTATAAA--
CECVspike	AGTGAAGTTGGTCTTGTCAATAAGAGTGTGTGTTACTACCTAGTTTCTATTACATACC
	* *

FIGURA 8 (Página 4 de 9)

CRCVspike	AATAGTGGTATAGGCACTTGTCTGCAGGTACTAATTATTTAACTTGTTATAATGCTAAC
CECVspike	AGTGTTAATATAACTATTGATCTTG---GTATGAAGCGTAGTGGTTATGGTCAACCCA--
	* * * ***** * * ** ** *** ** * ** * * * *
CRCVspike	CAATGTGATTGTTTGTGCACTCCAGAC--CCTATTTTATCTAAATCTACAGGGCCTTA-T
CECVspike	TAGCCTCAACACTAAGTAACATCACACTACCAATGCAGGATAATAACACCGATGTGTACT
	* * * * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * ** * * *
CRCVspike	AAGTGCCCCCAAATACTTAGTTGGCATAGGTGAGCACTGTTCTGGTCTTGCTATT
CECVspike	GTATTCGTTCTAACCAATT-CTCAGTTTATGTTCACTCCACTTGCAAAAGTTCTTTATGG
	* * * **** * * * * * * * * * ** ** *
CRCVspike	AAAAGTGATTATTGTGGAGGCAATCCTTGACTTGCCAACCAAAAGCATTTTTGGG--TT
CECVspike	GACAACAATTTTAATCAAGATTGCACAGATGTTTTATATGCCACAGCTGTTATAAAAAC
	* * **** * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	GGTCTGTGGAC--TCTTGTTTACAAGG--GGATAGGTGTAATATTTTTGCTAA-TTTTAT
CECVspike	GGTACTTGCCCCTTCTCATTTGATAAATTGAATAATTACTTAACTTTTAACAAGCTTTGT
	*** ** * **** ** * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TTTGCATGGTGT--TAATAGTG-----GTACTACTTGTTCTACTGATT-TACAAAAATC
CECVspike	TTGTCGTTGAATCCTACTGGTGCCAAGTGAAGTTTGATGTTGCTGCCCGTACAAGAACC
	** *
CRCVspike	AAACACAGACATAATTCTTGGTGTTTGTGTTAATTATGATCTTTATGGTATTACAGGCCA
CECVspike	AA-TGAGCAGGTGTTAGAAGTTTATATGTAATATATGAAGAAGGAGACAACATAGTGGG
	** *
CRCVspike	AGGTATTTTGTGTA---GGTTAATGCGACTTATTATAATAGTTGGCAGAACCTTTTAT
CECVspike	TGTACCGTCTGATAATAGTGGTCTTCACGATTTGTCAGTGTTACACTTAGACTCCTGTAC
	* *
CRCVspike	ATGATTCTAATG---GTAATCTCTATGGTTTTAGGGACTACTTAACAAACAGA-ACTTTT
CECVspike	A-GATTACAATATATATGGTAGAACTGGTGTT-GGTATTATTAGACAAACTAACAGCACA
	* **** * * * * * * * * * * * * * * * *

FIGURA 8 (Página 5 de 9)

CRCVspike	ATGATTTCGTAGTTGCTATAGCG-GTCGTGTTTCAGCGGGCTTTCA---CTCTAACTCTTC
CECVspike	ATACTTAGTGGCTTACATTATACATCACTATCAGGTGATTATTAGGTTTTAAAAATGTT
	** *** * * ** * * * * * * * *
CRCVspike	CGAACCAGCATTG-CTATTTTCGGAATATTAAATGCAATTACGTTTTTAATAATACTCTTT
CECVspike	AGTGATGGTGTGTCTATTCTGTGACACCATGTGATGTAAGCGCACAAAGCGGCTGTTATT
	* * *** ***** * * * * * * * * **
CRCVspike	CACG-----ACAGCTGCAACCTATTAACCTATTTTGATAGTTATCTTGGTTGTGTTGTCAA
CECVspike	GATGGGGCCATAGTTGGAGC-TATGACTTCCATTAATAGTGAAC-TTAGGTCTAACAC
	* * * ** * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TGCTGATAATAGTAC-----TTCTAGTTCTGTTCAAACATGTGATCTCACAGTAGGTAGT
CECVspike	ATTGGACAACAACACCAAATTTTTATTACTACTCTA-TATATAAT--ACAACAAATGAG
	** * * * ** * * * * * * * * * *
CRCVspike	GGTTACTGGGGGGATTACTCTACACAAAGACGAAGT-----CGTAGAACGATTACCACTGG
CECVspike	AGA-ACTCGTGGCACTGCAATCGACAGTAACGATGTAGATTGTGAACCTATCATAACCTA
	* *** * * * * * * *** ***** ** * * * * *
CRCVspike	TT-----ATCGGTTT----ACTAATTTTGAGCCATTTACTGTTAATCCAGTAAATGATAG
CECVspike	TTCTAACATAGGTGTTTGTAAAAATGGTGCGTTGGTTTATTAAACGTCACACATTCTGA
	** ** *** * * *** * * * * * * * ** *
CRCVspike	TTTACACCCTGTAGGTGGTTTGTAT--GAAAT-TCA-AATACCTTCAGAGTTTACTATAG
CECVspike	TGGAGATGTT-CAACCAATTAGCACTGGCAATGTCACGATACCCACAACTTTACCATAT
	* * * * * ** * * * *** *** ***** ** * ***** ***
CRCVspike	GTAATATGGAGGAGTTTATTCAAACAAGATCTCCTAAAGTTACTATTGATTGTCCTGTTT
CECVspike	CTGTGCAAGTTGAATACATCCAGGTTTACACTACACCGGTGTCAATAGATTGTTCTAGAT
	* * ** * ** ** ** * ** * * ***** ** *
CRCVspike	TTGTCTGTGGTGATTATGCAGCATGTAAATCACAGTTGGTTGAATATGGTAGTTTTTGTG
CECVspike	ACGTTTGTAAATGGTAACCCTAGATGTAATAAATTGTTAACACAATATGTTTCTGCATGTC
	** *** ** * * ***** * *** ***** * * ***

FIGURA 8 (Página 6 de 9)

CRCVspike	ACAATATTAATGCTATACTCACAG-AAGT-----AAATGAACTACTTGACACTA
CECVspike	AAACTATTGAGCAAGCGCTTGCAATGAGTGCCAGCCTTGAAAACATGGAAGTTGATTCCA
	* * * * * * ** * * * * * * *
CRCVspike	CACAGTTGCAAGTAGCTAATAGTTTAAATGAATGGTGTCACTCTTAGCACTAAGCTTAAAG
CECVspike	TGTTGTTTGTTCAGAAAATGCCCTTA-AATTGGCATCTGTTGAGGCGTTCAATAGTACA
	*** ** * * * * * * * * *
CRCVspike	ATGGCTTTAATTTCAATGTAGATGACAT----CAATTT---TTCCCCTGTATTAGGTTGT
CECVspike	GAACATTTAGATCCTATTTACAAAGAATGGCCTAACATAGGTGGTTCTTGGCTAGGAGGT
	***** * * * * * ** * * * ** ***** **
CRCVspike	TTAGGAAGCGAAT-----GTAATAA-AGTTTCCAGTA--GATCTGCTATAGAGGAT
CECVspike	CTAAAAGACATACTTCCGTCCCATAGCAACGTAAGTATCGTTCTGCTATAGAAGAC
	** * * * ***** * ***** * ***** ***** **
CRCVspike	TTACTTTTTTCTAAAGTAAAGTTATCTGATGTTGGTTTTGTTGATGC--TTATAATAAT
CECVspike	TTGCTTTTTGATAAAGTTGTAAGTTCTGGTCTAGGTACAGTTGATGAAGATTATAAACGT
	** ***** ***** ***** * * * ***** ***** *
CRCVspike	TGTACTGGAGGTGCCGAAATTAGGGACCTCATTTGTGTGCAAAGTTATAATGGTATCAAA
CECVspike	TGTACAGGTGGTTATGACATAGCTGACTTAGTTGTGCAACAATATTACAATGGCATCATG
	***** * * * ** * *** * ***** * * * ***** *****
CRCVspike	GTGTTGCCTC-CACTGCTCTCAGAAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCCACCTT
CECVspike	GTTCTACCTGGTGTGCTAAT-GATGACAAGATGACTATGTACACAGCCTCTCTTGCAGG
	** * * * **** ** * ***** * * ***** ** *
CRCVspike	TGCTAGTCTGTTTCCTCC-TTGGTCAGCAGCA--GCAGGCGTACCATTTTATTTAAATGT
CECVspike	TGGTATAGCATTAGGTGCACTAGGTGGTGGCGCCGTGGCTATACCTTTTGCAGTAGCAGT
	** * * * * * * * * * * ***** * * ** *
CRCVspike	TCAGTATCGTATTAATGGTATTGGTGTACCATGGATGTGCTAACTCAAAATCAAAAGCT
CECVspike	TCAGGCTAGACTTAATTATGTTGCTCTACAAACTGATGTATTGAACAAAAACCAGCAGAT
	***** * * ***** * * * * * ***** * * ***** * * *

FIGURA 8 (Pagina 7 de 9)

CRCVspike	TATTTCTAATGCATTTAACAATGCCCTTGATGCTATT-----CAGGAAGGGTT--
CECVspike	CCTGGCTAATGCTTTCAACCAAGCTATTGGTAACATTACACAGGCATTTGGTAAGGTTAA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TGATGCTA-----CCAATTCTGCT-----TTAGTTAAAT
CECVspike	TGATGCTATACATCAAACATCACAAAGGCTTGCCACTGTTGCTAAAGCATTTGGCAAAAGT
	***** * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TCAAGCTGTTGTTAATGCAAATGCTGAAGCTCTTAATAACTTATTGCAACAACCTCTCTAA
CECVspike	GCAAGATGTTGTTAACACACAAGGGCAAGCTTTAAGCCACCTAACAGTACAACCTGCAAAA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TAAATTTGGTGCTATAAGTGCTTCTTTACAAGAAATTCTATCTAGACTTGATGCTCTTGA
CECVspike	TAGCTTCCAAGCCATTAGTAGTTCATTAGTGACATTTATAATAGGCTTGATGAACGTAG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	AGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATCAATGGGCGTCTTACCGCTCTTAATGCTTATGT
CECVspike	TGCTGATGCACAGTTGATAGGCTGATTACAGGTAGACTTACAGCACTTAATGCATTTGT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAAAATTTAGTGAGCACAAGCTATGGAGAA
CECVspike	ATCTCAGACTCTAACCAGACAAGCGGAGGTTAGGCTAGTAGACAACCTTGCCAAAGACAA
	***** * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	GGTTAATGAATGTGTCAAAAGCCAATCATCTAGGATAAATTTTGTGGTAATGGTAATCA
CECVspike	GGTTAATGAATGTGTAGGCTCAGTCTCAGAGATTGGATTTTGTGGTAATGGTACACA
	***** * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TATTATATCATTAGTGCAGAATGCTCCATATGGTTTGTATTTATCCACTTTA-GCTATG
CECVspike	TTTGTTTTCACTTGCAAATGCAGCACCAAAATGGCATGGTTTCTTTTACACAGTGCTAT-
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CRCVspike	TCCCTACTAAGTATGTCAGTGCAGAGGTTAGTCCCGGCTGTGTCATYGCAGGTGATAGAG
CECVspike	TACCAACAGCTTATGAACTGTACAGCTTGGTCAGGTATTTGTGCTTCAGATGGCGATC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

FIGURA 8 (Pagina 8 de 9)

CRCVspike GTA-----TAGCTCCTAAGAGTGGTTATTT-----TGTT---AATGTAATAACA
CECVspike GCACITTTGGACTTGTGTTAAAGATGTTAGTTCAGTTCAGCTTGTTCGTAATCTAGATGACA
* * * * *** * * * * * **** *** * * * *

CRCVspike CTTGGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCCTGAACCTATAACTGGMAATAATGTGG
CECVspike AGTTCATATTTGACTCCCGAAGCATGTATCAGGCCTAGAGCTGCAACTAGTTCGTGATTTTG
* ** *** * * * ** * * ***** * * * * *

CRCVspike TTGTTATGAGTACCTGTGCTGTTAACTATACATAAGCACCGGATGTAATGCTGAACATTT
CECVspike TTCAGATTGAGGGGTGCGACGTGTTGTTGTCAATGCAACTGTAATTGACTTGCCTAGTA
** ** * * * * * * * * * * * * * *

CRCVspike CAACACCCAACTCCCTGATTTTAAAGGAG-----AGTTGATCAATGGTTAAAAAAC
CECVspike TTATACCTGACTATATCGACATTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAACCTACAGAC
* *** * * **** * * * * * * *

CRCVspike CAACATTAAATGGCACCGATTTGTCACTTGATTATATAAATGTTACATTTCTGGACCTA
CECVspike CAAC-TGGACTGTACCTGAATTGACAAATTGACATTTTTAACGCAAOCTATTTAAATCTG
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CRCVspike CAAGATGAAATGAATAGGTTACAGG--AGGCAATAAAGTT---TTAAATCATAGC----
CECVspike ACTGGTGAAATGTAGACTTTAGAATTTAGGTGAGAAAGCTACATACACCCACAGTAGAG
* ***** * * * * * * * * * * * * * *

CRCVspike -----TACAT-----CAATCTCAAGGACATTGGTACA
CECVspike CTTGCCATTCATTGACATATTAACAATACATTAGTCAATCTTGAATGGCTCAATAGA
 ***** ***** * * * *

CRCVspike TATGAATATTATGTAAAAATGGCCTTGGTATGTATGGCTTTTAAATTGGCCTTGCTGGCGTA
CECVspike ATTGAACTTATGTGAAATGGCCTTGGTATGTGTGGCTACTAATAGGC-TTAGTAGTAGT
*** ***** ***** ***** *** * * * *

CRCVspike GCTATGCTTGT-TTACTATTCTTCATATGCTGTGTGTACAGGATG---TGGGACTAGTTG
CECVspike GTTTTGCATACCGCTATTGCTATTTGCTGTTGTAGTACAGGTTGCTGTGNGATGCATAGG
* + * * * * * * * * * * * * * * * * * *

FIGURA 8 (Pagina 9 de 9)

CRCVspike	TTTAAAGAAATGCGGTGGTTGTTGTGATGATTATACTGGACA--TCAGGAGTTAGTAATC
CECVspike	TTGTTTGGGAAGTTGTTGTCATTCTATTGTAGTAGAAGACAATTTGAAAATTACGAACC
	** * * * * ** * * * * * ** * * * * *
CRCVspike	AA---AACGTCACATGACGACTAA-----
CECVspike	AATTGAAAAAGTGCATGTCCACTAAA-----
	** ** * * * *


```

BCVspike          ATGTTTTTGATACITTTAATTTCTTACCAATGGCTCTTGCTGTTATAG
HCVspike          -----ATGTTTTTGATACITTTAATTTCTTACCAACGGCTTTTGCTGTTATAG
CRCVspike         -----ATGTTTTTGATACITTTAATTTCTTACCAATGGCTTTTGCTGTTATAG
HEVspike          -----ATGTTTTTTATACITTTAATCACCCTGCTTCTGTTTTTGACAGTTATAG
                   *****
                   *****
                   *****

BCVspike          GAGATTTAAAGTGTA CTACGGTTCCATTAATGATGTTGACACCGGTGTTCCCTTCTGTTA
HCVspike          GAGATTTAAAGTGTA CTACGGTTCCATTAATGATATTTGACACCGGTGCTCCTTCTATTA
CRCVspike         GAGATTTAAAGTGTA CTACGGTTCCATCAATGATGTTGACACCGGTGCTCCTTCTATTA
HEVspike          GGGATTTAAAGTGTA AATACTTCATCAATTAATGACGTTGACACTGGTGTCATCTATTA
                   * *****
                   * *****
                   * *****

BCVspike          GCACTGATACTGTCGATGTTACTAATGGTTTAGGTA CTTATTATGTTTTAGATCGTGTGT
HCVspike          GCACTGATATTGTCGATGTTACTAATGGTTTAGGTACTTATTATGTTTTAGATCGTGTGT
CRCVspike         GCACTGATGTTGTCGATGTTACTAATGGTTTAGGTACTTATTATGTTTTAGATCGTGTGT
HEVspike          GCTCTGAAGTGTGTGATGTCACATAATGGTTTGGGGACTTTCATGTTTTAGATCGTGTCT
                   ** *****
                   ** *****
                   ** *****

BCVspike          ATTTAAATACTACGTTGTTGCTTAATGGTTACTACCTACTTCAGGTTCTACATATCGTA
HCVspike          ATTTAAATACTACGTTGTTGCTTAATGGTTACTACCTACTTCAGGTTCTACATATCGTA
CRCVspike         ATTTAAATACTACATTGTTGCTTAATGGTTATTATCCTACTTCAGGTTCTACATATCGTA
HEVspike          ATTTAAATACCACATTGTTGCTCAATGGTTATTACCCAATTTTCAGGTGCTACATTTCTGTA
                   *****
                   *****
                   *****

BCVspike          ATATGGCACTGAAGGGAAC TTACTATTGAGCAGCACTATGGTTTAAACCACCTTTTCITT
HCVspike          ATATGGCACTGAAGGGAAC TTACTATTGAGCAGCACTATGGTTTAAACCACCTTTTCITT
CRCVspike         ATATGGCACTGAAGGGAAC TTACTATTGAGCAGCACTATGGTTTAAACCACCACTTTTCITT
HEVspike          ATGTGGCTCTGAAAGGAAC TCGATTATTGAGCACCCTGTGGTTTAAAGCGCCTTTTITAT
                   ** *****
                   ** *****
                   ** *****

BCVspike          CTGATTTTATTAAATGGTATTTTGGCTAAGGTCAAAAATACCAAGGTTATTAAAAATGGTG
HCVspike          CTGATTTTATTAAATGGTATTTTGGCTAAGGTCAAAAATACCAAGGTTATTAAAAAGGGTG
CRCVspike         CTGATTTTATTGATGGTGT TTTGGCTAAGGTAAAAATACCAAGGTTATTAAAGATGGTG
HEVspike          CACCTTTTAAATGAGTATTTTGGCCAAGGTAAAAACAGCAGATTTTCTAAACATGGTG
                   * *****
                   * *****
                   * *****

```

FIGURA 9 (Pagina 2 de 12)

BCVspike	TAATGTATAGTGAGTTTCCTGCTATACTATAGGTAGTACTTTTGTAATACATCCTATA
HCVspike	TAATGTATAGTGAGTTTCCTGCTATACTATAGGTAGTACTTTTGTAATACATCCTATA
CRCVspike	TAGTGTATAGTGAGTTTCCTGCTATACTATAGGTAGTACTTTTGTAATACATCCTATA
HEVspike	TTATTTATAGTGAGTTTCCTGCTATTACTATAGGTAGTACTTTTGTAATACTTCCTATA
	* * *****
BCVspike	GTGTGGTAGTACAACCACATACTACCAATTTAGATAATAAATTACAAGGTCTCTTAGAGA
HCVspike	GTGTGGTAGTACAACCACATACTACCAATTTGGATAATAAATTACAAGGTCTCTTAGAGA
CRCVspike	GTGTGGTAGTACAACCACATACTACTAATTTAGATAATAAATTACAAGGTCTCTTAGAGA
HEVspike	GCATAGTAGTAAAGCCTCATACCTCATTTATTAAATGGTAATTTACAAGGTTTTTGCAAA
	* * *****
BCVspike	TCTCTGTTTGCCAGTATACTATGTGCGAGTACCCACATACGATTTGTCTCCTAATTTGG
HCVspike	TCTCTGTTTGCCAGTATACTATGTGCGAGTACCCACATACGATTTGTCTCCTAATTTGG
CRCVspike	TCTCTGTTTGCCAGTATACTATGTGCGAGTACCCACATACGATTTGTCTCCTAATTTGG
HEVspike	TTTCTGTTTGTCAATATCTATGTGTGAATACCCACAGACTATTTGTCTCCTAATTTGG
	* * *****
BCVspike	GTAATCGGCGCATAGAACTATGGCATTGGGATACAGGTGTTGTTTCCTGTTTATATAAGC
HCVspike	GTAATCGACGCGTAGAACTATGGCATTGGGATACAGGTGTTGTTTCCTGTTTATATAAGC
CRCVspike	GTAATAAACGCATAGAACTATGGCATTGGGATACAGGTGTTGTTTCCTGTTTATATAAGC
HEVspike	GTAATCAACGCATAGAACTATGGCATCATGACACAGATGTTGTTTCTTGTATACAGGC

BCVspike	GTAATTTACATATGATGTGAATGCTGATTATTTGTATTTCCATTTTATCAAGAAGGTG
HCVspike	GTAATTTACATATGATGTGAATGCTGATTACTTGTATTTCCATTTTATCAAGAAGGTG
CRCVspike	GTAATTTACATATGATGTGAATGCTGATTATTTGTATTTCCATTTTATCAAGAAGGTG
HEVspike	GTAATTTACATATGATGTGAATGCTGATTATTTATATTTTCACTTTTATCAGGAAGGTG

BCVspike	GTACTTTTATGCATATTTTACAGACACTGGTGTGTTACTAAGTTTCTGTTTAAATGTTT
HCVspike	GTACTTTTATGCATATTTTACAGACACTGGTGTGTTACTAAGTTTCTGTTTAAATGTTT
CRCVspike	GTACTTTTATGCATATTTTACAGACACTGGTGTGTTACTAAGTTTCTGTTTAAATGTTT
HEVspike	GCACTTTTATGCATATTTTACAGATACTGGTTTGTGACCAAGTTTCTGTTTAAATGTTT
	* * *****

FIGURA 9 (Pagina 3 de 12)

BCVspike	ATTTAGGCACGGTGCTTTACACATTATATGTCATGCCTTTGACTTGTAAAGTGTCTATGA
HCVspike	ATTTAGGCACGGTGCTTTACACATTATATGTCCTGCCTTTGACTTGTAAAGTGTCTATGA
CRCVspike	ATTTAGGCACGGTGCTTTACACATTATATGTCATGCCCTTGACTTGTAAAGTGTCTATGA
HEVspike	ATTTAGGCACTGTGCTGTACACACTATTATGTTATGCCATTGACTTGTGATAGCGCTTTAT *****+ *****+ ****+ *****+ ****+ ****+ *
BCVspike	CTTTAGAATATTGGGTTACACCTCTCACCCTCTAAACAATATTTACTCGCTTTCAATCAAG
HCVspike	CTTTAGAATATTGGGTTACACCTCTCACCCTCTAAACAATATTTACTAGCTTTCAATCAAG
CRCVspike	CTTTAGAATACTGGGTTACACCTCTCACCCTTTAAACAATATTTACTCGCTTTCAATCAAG
HEVspike	CTTTAGAATATTGGGTTACACCTCTCACCCTACTAGACAAATTCCTTCTAGCCTTTGACCAGG *****+ *****+ ****+ *****+ ****+ ****+ *
BCVspike	ATGGTGTTATTTTTAATGCTGTTGATTGTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAAGTGTA
HCVspike	ATGGTGTTATTTTTAATGCTGTTGATTGTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAAGTGTA
CRCVspike	ATGGTGTTATTTTTAATGCTGTTGATTGTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAAGTGTA
HEVspike	ATGGTGTTTTATACCATGCTGTTGATTGTGCTAGTGATTTTATGAGTGAGATTATGTGTA *****+ *+ *****+ *****+ *****+ *****+ *****+
BCVspike	AAACACATCTATAGCACCATCTACTGGTGTTTATGAATTAAACGGTTACACTGTTCCAGC
HCVspike	AAACACATCTATAGCACCATCTACTGGTGTTTATGAATTAAACGGTTACACTGTTCCAGC
CRCVspike	AAACACATCTATAGCACCATCTACTGGTGTTTATGAATTAAACGGTTACACTGTTCCAGC
HEVspike	AAACTTCTTCAAATTACACCACCTACTGGTGTTTATGAACTAAACGGTTACACAGTTCAAC ****+ **+ **+ *****+ *****+ *****+ *****+ *****+
BCVspike	CAATTGCAGATGTTTACCAGCGTATACCTAATCTTCCCATTGTAATATAGAGGCTTGGC
HCVspike	CAATTGCAGATGTTTACCAGCGTATACCTAATCTTCCCATTGTAATATAGAGGCTTGGC
CRCVspike	CAATTGCAGATGTTTACCAGCGTATACCTAATCTTCCCATTGTAATATAGAGGCTTGGC
HEVspike	CTGTTGCCACTGTGTATCGTAGAATACCTGACTTACCCAATTGCGATATCGAAGCTTGGC *+ ****+ ***+ **+ **+ *+ *****+ *+ *+ **+ ****+ ****+ **+ *****+
BCVspike	TTAATGATAAGTCTGTGCCCTCTCCATTAAATTGGGAACGTAAAGACCTTTTCAAATTGTA
HCVspike	TTAATGATAAGTCGGTGCCCTCTCCATTAAATTGGGAACGTAAAGACCTTTTCAAATTGTA
CRCVspike	TTAATGATAAGTCGGTGCCCTCTCCATTAAATTGGGAACGTAAAGACCTTTTCAAATTGTA
HEVspike	TTAATTCTAAGACCGTTTCTTGCCCTCTTAATTGGGAACGTAAAAATTTTCTAATTGTA *****+ ****+ ****+ ****+ ****+ ****+ *****+ ****+ ****+ *****+

FIGURA 9 (Pagina 4 de 12)

BCVspike	ATTTTAATATGAGCAGCCTGATGTCITTTATTCAGGCAGACTCATTACTTGTAATAATA
HCVspike	ATTTTAATATGAGCAGCCTGATGTCITTTATTCAGGCAGACTCATTACTTGTAATAATA
CRCVspike	ATTTTAATATGAGCAGCCTGATGTCITTTATCCAGGCTGACTCGTTTACTTGTAATAATA
HEVspike	ATTTTAACATGGGCAGGCTGATGTCITTTATTCAGGCTGACTCTTTTGGTTGTAACAATA
	***** ** *
BCVspike	TTGATGCAGCTAAGATATATGGTATGTGTTTTCCAGCATAACTATAGATAAGTTTGCTA
HCVspike	TTGATGCTGCTAAGATATATGGTATGTGTTTTCCAGCATAACTATAGATAAGTTTGCTA
CRCVspike	TTGATGCTGCTAAGATATACGGTATGTGTTTTCCAGCATAACTATAGATAAGTTTGCTA
HEVspike	TTGATGCTTCTCGCTTATATGGTATGTGTTTGGIAGCATTACTATTGACAAGTTTGCTA
	***** ** ****
BCVspike	TACCCAATGGTAGGAAGGTTGACCTACAATTGGGCAATTGGGCTATTGTCAGTCTTTTA
HCVspike	TACCCAATGGTAGGAAGGTTGACCTACAATTGGGCAATTGGGCTATTGTCAGTCTTTTA
CRCVspike	TACCCAATGGTAGGAAGGTTGACCTACAATGGGCAATTGGGCTATTGTCAGTCTTTTA
HEVspike	TACCCAATAGTAGAAAGGTTGATCTGCAAGTGGGTAAATCTGGTTATTACAATCTTTTA
	***** ** *
BCVspike	ACTATAGAATTGATACTACTGCTACAAGTTGTCAGTTGTATTATAATTTACCTGCTGCTA
HCVspike	ACTATAGAATTGATACTACTGCTACAAGTTGTCAGTTGTATTATAATTTACCTGCTGCTA
CRCVspike	ACTATAGAATTGATACTACTGCTACAAGTTGTCAGTTGTATTATAATTTACCTGCTAGTA
HEVspike	ATTATAAGATTGACACTGCTGTTAGCAGTTGTCAACTCTATTATAGTTTGCTGTCAGCAA
	* **** * *
BCVspike	ATGTTTCTGTTAGCAGGTTTAAATCCTTCTACTTGGAATAGGAGATTGGTTTTACAGAAC
HCVspike	ATGTTTCTGTTAGCAGGTTTAAATCCTTCTACTTGGAATAGGAGATTGGTTTTACAGAAC
CRCVspike	ATGTTTCTATTAGCAGGTTTAAATCCTTCTATTGGAATAGGAGATTGGTTTTACAGAAC
HEVspike	ACGTATCTGTCACCTCATTATAATCCTTCATCTTGGAACAGAGGTATGGGTTTAT----T
	* ** * * *
BCVspike	AATCTGTTTTAAGCCTCAACCTGTAGGTGTTTTACTGATCATGATGTTGTTTATGCAC
HCVspike	AATCTGTTTTAAGCCTCAACCTGTAGGTGTTTTACTCATCATGATGTTGTTTATGCAC
CRCVspike	AATCTGTTTTAAGCCTCAACCTGTAGGTGTTTTACTGATCATGATGTTGTTTATGCAC
HEVspike	AATCAGAGTTTGGTTCCAG-----AGGC-CIT-----CATGATGCTGATATTTCAC
	**** * ** *

FIGURA 9 (Pagina 5 de 12)

BCVspike	AACATTGTTTTAAAGCTCCACAAAATTTCTGTCCGTGTAAATTGGATGGGTCTTTGTGTG
HCVspike	AACATTGTTTTAAAGCTCCACAAAATTTCTGTCCGTGTAAATTGGATGGGTCTTTGTGTG
CRCVspike	AACATTGTTTTAAAGCTCCACAAAATTTCTGTCCGTGTAAATTGGAATGGGTCTTTGTGTG
HEVspike	AGCAATGTTTTAATACACCTAATACATATTGTCCTTGTA----GAACAAGTC--AATGCA
	* * * * *
BCVspike	TAGGTAGTGGTTCGGTATAGATGCTGGTTATAAAAATAGTGGTATAGGCACTTGTCTCG
HCVspike	TAGGTAAATGGTCCTGGTATAGATGCTGGTTATAAAAATAGTGGTATAGGCACTTGTCTCG
CRCVspike	TAGGTAGTGGTTTTGGTATAGATGCTGGTTATAAAAATAGTGGTATAGGCACTTGTCTCG
HEVspike	TAGGTGGTG---CTGGCACAGGAACCTTGTCTGTAGGCACCACTGTGCGCAAGTGTGTTG
	* * * * *
BCVspike	CAGGTACTAATTATTTAACTTGTCTAATGCTGCCCAATGTAATTGTTTGTGCACTCCAG
HCVspike	CAGGTACTAATTATTTAACTTGTCTAATGCTGCCCAATGTGATTGTTTGTGCACTCCCG
CRCVspike	CAGGTACTAATTATTTAACTTGTCTAATGCTAACCAATGTGATTGTTTGTGCACTCCAG
HEVspike	CTG---C-AGTTAC--A-----AACGCTACTAAGTGTACTTGTCTGGTGTCAACCAG
	* * * * *
BCVspike	ACCCATTACATCTAAATCTACAGGGCCTTATAAGTGCCCCCAAACCTAAATATTAGTTG
HCVspike	ACCCATTACATCTAAATCTACAGGGCCTTACAAGTGCCCCCAAACCTAAATATTAGTTG
CRCVspike	ACCCTATTTTATCTAAATCTACAGGGCCTTATAAGTGCCCCCAAACCTAAATATTAGTTG
HEVspike	ATCCTTCACATATAAAGGTGTAAATGCCTGGACTTGTCCGCAATCTAAAGTTTCTATAC
	* * * * *
BCVspike	GCATAGGTGAGCACTGTTTCGGGTCTTGCTATTAAAAGTGATTATTGTGGAGGTAATCCTT
HCVspike	GCATAGGTGAGCACTGTTTCGGGTCTTGCTATTAAAAGTGATTATTGTGGAGGTAATCCTT
CRCVspike	GCATAGGTGAGCACTGTTCTGGTCTTGCTATTAAAAGTGATTATTGTGGAGGCAATCCTT
HEVspike	AACCAGGTCAGCAATTGCCCTGGCTGGGTCTTGTGGAGGATGATTGCTCTGGTAATCCTT
	* * * * *
BCVspike	GTACTTGCCAACCAAGCATTTTGGGTGGTCTGTTGATTCTTGTTTACAAGGGGATA
HCVspike	GTACTTGCCAACCAAGCATTTTGGGTGGTCTGTTGACTCTTGTTTACAAGGGGATA
CRCVspike	GTACTTGCCAACCAAGCATTTTGGGTGGTCTGTTGACTCTTGTTTACAAGGGGATA
HEVspike	GCACTTGTAACCAAGCATTTTATAGGCTGGAGTTCAGAACTTGTGCAAAATGGTA
	* * * * *

FIGURA 9 (Pagina 6 de 12)

BCVspike	GGTGTAAATATCTTTGCTAATTTTATTTTGCATGATGTTAATAGTGGTACTACTTGTTCCTA
HCVspike	GGTGTAAATATTTTGTCTAATTTTATTTTGCATGATGTTAATAGTGGTACTACTTGTTCCTA
CRCVspike	GGTGTAAATATTTTGTCTAATTTTATTTTGCATGGTGTAAATAGTGGTACTACTTGTTCCTA
HEVspike	GGTGTAAATATTTTGTCTAATTTTATTTTGAATGATGTTAATAGCGGTACTACCTGTTCTA

BCVspike	CTGATTTACAAAATCAAACACAGACATAATCTTGGTGTGTTGTGTTAATTATGATCTTT
HCVspike	CTGATTTACAAAATCAAACACAGACATAATCTTGGTGTGTTGTGTTAATTATGATCTTT
CRCVspike	CTGATTTACAAAATCAAACACAGACATAATCTTGGTGTGTTGTGTTAATTATGATCTTT
HEVspike	CTGATTTACAACAGGTAATACTAATATTACTACTGATGTTTGTGTTAATTATGACCTAT

BCVspike	ATGGTATTACAGGCCAAGGTATTTTGTGAGGTTAATGCCGACTTATTATAATAGTTGGC
HCVspike	ATGGTATTACAGGCCAAGGTATTTTGTGAGGTTAATGCCGCTTATTATAATAGTTGGC
CRCVspike	ATGGTATTACAGGCCAAGGTATTTTGTGAGGTTAATGCCGACTTATTATAATAGTTGGC
HEVspike	ATGGCATTACAGGCCAGGCATCTTATAGAGTTAATGCCACGTATTATAATAGTTGGC

BCVspike	AGAACCCTTTTATATGATTCTAATGGTAATCTCTATGGTTTTAGAGACTACTTAACAAACA
HCVspike	AGAACCCTTTTATATGATTCTAATGGTAATCTCTATGGTTTTAGAGACTACTTAACAAACA
CRCVspike	AGAACCCTTTTATATGATTCTAATGGTAATCTCTATGGTTTTAGGGACTACTTAACAAACA
HEVspike	AGAATCTTCTTTATGATTCTAGTGGTAATCTCTATGGCTTTAGAGATTATTTATCAATA

BCVspike	GAACCTTTTATGATTCGTAGTTGCTATAGCGGTCGTGTTTCAGCGGCCTTCATGCTAATT
HCVspike	GAACCTTTTATGATTCGTAGTTGCTATAGCGGTCGTGTTTCAGCGGCCTTCATGCTAATT
CRCVspike	GAACCTTTTATGATTCGTAGTTGCTATAGCGGTCGTGTTTCAGCGGCCTTCATGCTAATT
HEVspike	GAACCTTTCTTATTCGTAGCTGCTATAGTGAAGAGTTTCAGCAGTCTTCATGCTAATT

BCVspike	CTTCCGAACCAGCATTTGCTATTTTCGGAATATTAAATGCAATTACGTTTTTAATAAATACTC
HCVspike	CTTCCGAACCAGCATTTGCTATTTTCGGAATATTAAATGCAGTTACGTTTTTAATAAATACTC
CRCVspike	CTTCCGAACCAGCATTTGCTATTTTCGGAATATTAAATGCAATTACGTTTTTAATAAATACTC
HEVspike	CTTCTGAACCAGCTTTGATGTTTCGTAATCTTAAATGCAGCCACGTTTTTAATTATACCA

FIGURA 9 (Pagina 7 de 12)

BCVspike	TTTCACGACAGCTGCAACCTATTAACATATTTGATAGTTATCTTGGTTGTGTTGTCAATG
HCVspike	TTTCACGACAGCTGCAACCTATTAACATATTTGATAGTTATCTTGGTTGTGTTGTCAATG
CRCVspike	TTTCACGACAGCTGCAACCTATTAACATATTTGATAGTTATCTTGGTTGTGTTGTCAATG
HEVspike	TTTAAAGACAAATACAGCTTGTTAATTATTTGATAGTTACCTTGGTTGTGTTGTAAATG
	*** * **** * ** * * **** * **** * **** * **** *
BCVspike	CTGATAATAGTACTTCTAGTGCTGTTCAAAACATGTGATCTCACAGTAGGTAGTGGTTACT
HCVspike	CTGATAATAGTACTTCTAGTGTTGTTCAAAACATGTGATCTCACAGTAGGTAGTGGTTACT
CRCVspike	CTGATAATAGTACTTCTAGTTCTGTTCAAAACATGTGATCTCACAGTAGGTAGTGGTTACT
HEVspike	CTTATAATAATACAGCTAGTGCTGTAAGTACTTGTGATTTAACCGTTGGTAGCGGCTATT
	** * **** * * **** * ** * * **** * * * * **** * * * *
BCVspike	GTTGGGATTACTCTACAAAAGACGAAGTCGTAGAGCGATTACCACTGGTTATCGGTTTA
HCVspike	GTGTGGATTACTCTACAAAAGACGAAGTCGTAGAGCGATTACCACTGGTTATCGGTTTA
CRCVspike	GGGGGGATTACTCTACAAAAGACGAAGTCGTAGAACGATTACCACTGGTTATCGGTTTA
HEVspike	GTGTTGATTATGTTACAGCACTTAGATCACGTAGATCTTTACTACAGGTTATCGCTTTA
	* * * **** * ** * * * * **** * * * * * * **** * * *
BCVspike	CTAATTTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAAATGATAGTTTAGAACCCTAGGTGGTT
HCVspike	CTAATTTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAAATGATAGTTTAGAACCCTAGGTGGTT
CRCVspike	CTAATTTTGAGCCATTTACTGTTAATCCAGTAAATGATAGTTTACACCCCTAGGTGGTT
HEVspike	CTAATTTTGAACCATTTGCCGCTAATTTGGTAAATGATAGTATAGAACCCTGTTGGTGGTT
	***** * **** * * **** * **** * * * * **** * * * *
BCVspike	TGTATGAAATTCAAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTAATATGGAGGAGTTTATTCAAA
HCVspike	TGTATGAAATTCAAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTAATATGGAGGAGTTTATTCAAA
CRCVspike	TGTATGAAATTCAAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTAATATGGAGGAGTTTATTCAAA
HEVspike	TGTATGAAATACAGATACCTTCAGAGTTTACCATTGGTAATTTAGAAGAATTCATTCAAA
	***** * * **** * * **** * * * * * * * * * * * *
BCVspike	TAAGCTCTCCTAAAGTTACTATTGATTGTTCTGCTTTTGTCTGTGGTGATTATGCAGCAT
HCVspike	CAAGCTCTCCTAAAGTTACTATTGATTGTTCTGCTTTTGTCTGTGGTGATTATGCAGCAT
CRCVspike	CAAGATCTCCTAAAGTTACTATTGATTGCTCTGTTTGTCTGTGGTGATTATGCAGCAT
HEVspike	CGAGTTCCCTAAGGTTACTATAGATTGTGCTACATTTGTTTGTGGTGACTATGCTGCAT
	** * * **** * **** * * **** * * * * * * **** * * *

FIGURA 9 (Pagina 8 de 12)

BCVspike	GTAAATCACAGTTGGTTGAATATGGTAGTTTCTGTGACAAATTAATGCTATACTCACAG
HCVspike	GTAAATCACAGTTGGTTGAATATGGTAGCTTCTGTGACAAATTAATGCTATACTCACAG
CRCVspike	GTAAATCACAGTTGGTTGAATATGGTAGTTTTTGTGACAAATTAATGCTATACTCACAG
HEVspike	GTAGACAACAGTTAGCTGAGTATGGTAGTTTTTGTGAGAACATTAATGCTATACTCATAG
	*** * ***** * *** ***** ** ***** ** ***** ***** **
BCVspike	AAGTAAATGAACACTTGGACACTACACAGTTGCAAGTAGCTAATAGTTTAAATGAATGGTG
HCVspike	AAGTAAATGAACACTTGGACACTACACAGTTGCAAGTAGCTAATAGTTTAAATGAATGGTG
CRCVspike	AAGTAAATGAACACTTGGACACTACACAGTTGCAAGTAGCTAATAGTTTAAATGAATGGTG
HEVspike	AAGTAAATGAACACTTGGACACTACACAGTTGCAAGTAGCTAATAGTTTAAATGAATGGAG

BCVspike	TCACCTCTAGCACTAAGCTTAAAGATGGCGTTAATTTCAATGTAGACGACATCAATTTTT
HCVspike	TCACCTCTAGCACTAAGCTTAAAGATGGCGTTAATTTCAATGTAGACGACATCAATTTTT
CRCVspike	TCACCTCTAGCACTAAGCTTAAAGATGGCGTTAATTTCAATGTAGATGACATCAATTTTT
HEVspike	TCACCCTTAGTACTAAGATTAAAGATGGGATTAAATTTCAATGTTGACGATATCAACTTCT
	*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** * ***** ** *
BCVspike	CCCCGTATTAGGTTGTTTAGGAAGCGATTGTAATAAAGTTTCCAGTAGATCTGCTATAG
HCVspike	CCCCGTATTAGGTTGTTTAGGAAGCGCTTGTAATAAAGTTTCCAGCAGATCTGCTATAG
CRCVspike	CCCCGTATTAGGTTGTTTAGGAAGCGAATGTAATAAAGTTTCCAGTAGATCTGCTATAG
HEVspike	CCTCTGTATTAGGTTGTTTAGGAAGCGAATGTAACAGAGCTTCCACTAGATCTGCTATAG
	** ***** ***** * ** ***** *****
BCVspike	AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTTATCTGATGTCGGTTTTGTTGAGGCTTATAATA
HCVspike	AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTTATCTGATGTCGGTTTCGTTGAGGCTTATAATA
CRCVspike	AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTTATCTGATGTTGGTTTTGTTGATGCTTATAATA
HEVspike	AGGATTTACTTTTTGATAAAGTAAATTTGCTGATGTCGGTTTTGTACAGGCCCTATAATA
	***** ***** ** ***** ***** ** * ** *****
BCVspike	ATTGTACTGGAGGTGCCGAAATTAGGGACCTCATTTGTGTGCAAAGTTATAATGGTATCA
HCVspike	ATTGTACTGGAGGTGCCGAAATTAGGGACCTCATTTGTGTGCAAAGTTATAATGGTATCA
CRCVspike	ATTGTACTGGAGGTGCCGAAATTAGGGACCTCATTTGTGTGCAAAGTTATAATGGTATCA
HEVspike	ACTGCACTGGAGGAGCCGAAATTAGGGATCTCATTTGTGTGCAAAGTTATAATGGTATCA
	* ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

FIGURA 9 (Pagina 9 de 12)

BCVspike	AAGTGTGCTCCACTACTCTCAGAAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCTACCT
HCVspike	AAGTGTGCTCCACTGCTCTCAGTAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCCACCT
CRCVspike	AAGTGTGCTCCACTGCTCTCAGAAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCCACCT
HEVspike	AAGTGTGCTCCATTGTTATCTGAAAATCAGATTAGTGGTTACACTTCGGCAGCCACCG ***** * * * * *****
BCVspike	CTGCTAGTCTGTTTCTCCTTGGTCAGCAGCAGCAGGCGTACCATTTTATTTAAATGTTT
HCVspike	CTGCTAGTCTGTTTCTCCTTGGTCAGCAGCAGCAGGCGTACCATTTTATTTAAATGTTT
CRCVspike	TTGCTAGTCTGTTTCTCCTTGGTCAGCAGCAGCAGGCGTACCATTTTATTTAAATGTTT
HEVspike	CTGCTAGCCTATTCTCCTCCCTGGACAGCTGCAGCAGGCGTACCATTTTATTTAAATGTTT ***** ** *****
BCVspike	AGTATCGTATTAATGGGATTGGTGTACCATGGATGTTCTAAGTCAAAATCAAAGCTTA
HCVspike	AGTATCGTATTAATGGGATTGGTGTACCATGGATGTTCTAAGTCAAAATCAAAGCTTA
CRCVspike	AGTATCGTATTAATGGTATTGGTGTACCATGGATGTGCTAACTCAAAATCAAAGCTTA
HEVspike	AGTATCGTATAAATGGGCTTGGCGTCACCATGGATGTGCTAAGCCAAAACCAAAGCTTA ***** *****
BCVspike	TTGCTAATGCATTTAACAATGCCCTTGATGCTATTAGGAAGGGTTTGATGCTACCAATT
HCVspike	TTGCTAATGCATTTAGCAATGCTCTTGATGCTATTAGGAAGGGTTTGATGCTACCAATT
CRCVspike	TTTCTAATGCATTTAACAATGCCCTTGATGCTATTAGGAAGGGTTTGATGCTACCAATT
HEVspike	TTGCTAGTGCATTTAACAACGCTCTTGATTCTATCCAGGAAGGGTTGACGCAACCAATT ** *** *****
BCVspike	CTGCTTTAGTTAAAATTCAGCTGTTGTTAATGCAAATGCTGAAGCTCTTAATAACTTAT
HCVspike	CTGCTTTAGTTAAAATTCAGCTGTTGTTAATGCAAATGCTGAAGCTCTTAATAACTTAT
CRCVspike	CTGCTTTAGTTAAAATTCAGCTGTTGTTAATGCAAATGCTGAAGCTCTTAATAACTTAT
HEVspike	CTGCTTTAGTTAAAATTCAGGCTGTTGTTAATGCAAATGCTGAAGCACTTAATAACTTAT *****
BCVspike	TGCAACAACTCTCTAATAGATTGGTGCTATAAGTTCTTCTTACAAGAAATTCATCTA
HCVspike	TGCAACAACTCTCTAATAGATTGGTGCTATAGGTTCTTCTTACAAGAAATTCATCTA
CRCVspike	TGCRACAACTCTCTAATAAATTTGGTGCTATAAGTGCTTCTTACAAGAAATTCATCTA
HEVspike	TGCAGCAACTCTCTAACAGATTGGTGCCATAAGTGCTCTTACAAGAAATTTATCCA *** *****

FIGURA 9 (Pagina 10 de 12)

BCVspike	GACTTGATGCTCTTGAAGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGGCGTCTTACCG
HCVspike	GACTGGATGCTCTTGAAGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGGCGTCTTACCG
CRCVspike	GACTTGATGCTCTTGAAGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATCAATGGGCGTCTTACCG
HEVspike	GGCTCGATGCTCTTGAAGCTAAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGGCGTCTCACCG
	* ** *****
BCVspike	CTCTTAATGCTTATGTTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAAATTTAGTGCGAG
HCVspike	CTCTTAATGCTTATGTTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAAATTTAGTGCGAG
CRCVspike	CTCTTAATGCTTATGTTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAAATTTAGTGCGAG
HEVspike	CTCTTAATGCTTATGTTTCTCAGCAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAAATTTAGTGCGAG

BCVspike	CACAAGCTATGGAGAAGGTTAATGAATGTGTCAAAGCCAATCATCTAGGATAAAATTTT
HCVspike	CACAAGCTATGGAGAAGGTTAATGAATGTGTCAAAGCCAATCATCTAGGATAAAATTTT
CRCVspike	CACAAGCTATGGAGAAGGTTAATGAATGTGTCAAAGCCAATCATCTAGGATAAAATTTT
HEVspike	CACAAGCTATTGAGAAAGTTAATGAATGTGTAAAAGCCAATCATCTAGGATAAAATTTCT

BCVspike	GTGGTAATGGTAATCATATTATATCATTAGTGCAGAAATGCTCCATATGGTTTGTATTTTA
HCVspike	GTGGTAATGGTAATCATATTATATCATTAGTGCAGAAATGCTCCATATGGTTTGTATTTTA
CRCVspike	GTGGTAATGGTAATCATATTATATCATTAGTGCAGAAATGCTCCATATGGTTTGTATTTTA
HEVspike	GTGGTAATGGTAATCATATTATATCATTAGTACAGAAATGCTCCATATGGTTTGTATTTTA

BCVspike	TCCACTTTAGCTATGTCCCTACTAAGTATGTCACGTGCGAAGGTTAGTCCCGGTCTGTGCA
HCVspike	TCCACTTTAGCTATGTCCCTACTAAGTATGTCACGTGCGAAGGTTAGTCCCGGTCTGTGCA
CRCVspike	TCCACTTTAGCTATGTCCCTACTAAGTATGTCACGTGCGAAGGTTAGTCCCGGTCTGTGCA
HEVspike	TCCATTTTAGCTATGTCCCAAGTATGTTACAGCAAAGGTTAGTCTGCTGGTTTGTGCA
	**** ***** ** ***** ** * ***** *** *****
BCVspike	TTGCTGGTGATAGAGGTATAGCCCCAAGAGTGGTATTTTGTAAATGTAAATAAACAATT
HCVspike	TTGCTGGTGATAGAGGTATAGCCCCAAGAGTGGTATTTTGTAAATGTAAATAAACAATT
CRCVspike	TYGCAGGTGATAGAGGTATAGCTCCTAAGAGTGGTATTTTGTAAATGTAAATAAACAATT
HEVspike	TTGCTGGCGATATAGGAATATCGCCTAAGAGTGGTATTTTATTAATGTAAATAAACAATT
	* ** ** ***** ** * ***** ***** **

FIGURA 9 (Pagina 11 de 12)

BCVspike	GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCTGAACCTATAACTGGAAATAATGTTGTTG
HCVspike	GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCTGAACCCATAACTGGAAATAATGTTGTTG
CRCVspike	GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCTGAACCTATAACTGGAAATAATGTTGTTG
HEVspike	GGATGTTCACTGGTAGTGGCTATTACTACCTGAACCTATAACCCAAATAATGTTGTTG

BCVspike	TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTACACTAAAGCACCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
HCVspike	TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTACTATAAGCGCCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
CRCVspike	TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTACTATAAGCACCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
HEVspike	TGATGAGTACCTGTGCTGTTAATTACTATAAGCACCGGATCTAATGCTGAACACATCGA
	* ***** ** ***** ***** ** *
BCVspike	CACCCAACTCCCTGATTTTAAGGAAGAGTTGGATCAATGGTTTAAAAACCAACATCAG
HCVspike	CACCCAACTCCATGATTTTAAGGAAGAGTTGGATCAATGGTTTAAAAACCAACATCAG
CRCVspike	CACCCAACTCCCTGATTTTAAGGAAGAGTTGGATCAATGGTTTAAAAACCAACATTA
HEVspike	CACCCAACTTCCTGATTTCAAGGAAGAATTGTATCAATGGTTTAAAAACCAATCTTCAT
	***** * ***** ** ***** ***** * *
BCVspike	TGGCACCAGATTGTCACTTGATTATATAAATGTTACATTCTTGGACCTACAAGATGAAA
HCVspike	TGGCACCAGATTGTCACTTGATTATATAAATGTTACATTCTTGGACCTACAAGATGAAA
CRCVspike	TGGCACCAGATTGTCACTTGATTATATAAATGTTACATTCTTGGACCTACAAGATGAAA
HEVspike	TGGCACCAGATTGTCAATTGATTATATTAATGTTACGTTCTTGGACCTACAAGATGAAA
	***** ***** ***** ***** *****
BCVspike	TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAAGGACA
HCVspike	TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAAGGACA
CRCVspike	TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAAGTTTAAATCATAGCTACATCAATCTCAAGGACA
HEVspike	TGAATAGGTTACAAGAAGCTATAAAAGTTCTAAATCATAGCTACATCAATCTCAAGGACA
	***** ** * ***** ***** *****
BCVspike	TTGGTACATATGAGTATTATGTAAAAATGGCCTTGGTATGTATGGCTTTTAAATTGGCCTTG
HCVspike	TTGGTACATATGAGTATTATGTAAAAATGGCCTTGGTATGTATGGCTTTTAAATTGGCCTTG
CRCVspike	TTGGTACATATGAATATTATGTAAAAATGGCCTTGGTATGTATGGCTTTTAAATTGGCCTTG
HEVspike	TTGGTACATATGAGTATTATGTAAAAATGGCCTTGGTATGTATGGCTTTTAAATTGGCCTTG
	***** ***** ***** ***** ***** ** **

FIGURA 9 (Pagina 12 de 12)

BCVspike	CTGGTGTAGCTATGCTTGTGTTTACTATTCTTCATATGCTGTTGTACAGGATGTGGGACTA
HCVspike	CTGGTGTAGCTATGCTTGTGTTTACTATTCTTCATATGCTGTTGTACAGGATGTGGGACTA
CRCVspike	CTGGCGTAGCTATGCTTGTGTTTACTATTCTTCATATGCTGTTGTACAGGATGTGGGACTA
HEVspike	CTGGTGTAGTTATGCTTGTGTTTACTATTCTTCATATGCTGCTGTACAGGATGTGGGACTA
	**** **** *****
BCVspike	GTTGTTTTAAGAAATGTGGTGGTTGTTGTGATGATTATAC-----
HCVspike	GTTGTTTTAAGATATGTGGTGGTTGTTGTGATGATTATACTGGACACCAGG-----
CRCVspike	GTTGTTTTAAGAAATGCGGTGGTTGTTGTGATGATTATACTGGACATCAGG-----
HEVspike	GTTGTTTTAAGAAATGTGGCGGTGTTTTGTGATGATTATACTGGACACCAGGAGTTTGTA
	***** *** ** *****
BCVspike	-----
HCVspike	-----
CRCVspike	-----
HEVspike	TCAAACTTCACATGACGATTAATTTTCGT

FIGURA 10 (Página 1 de 5)

BCVspikepro	----MFLILLISLPMALAVIGDLKCTTVSINDVDTGVPSVSTDTVDVTNGLGTYVLD
HCVspikepro	----MFLILLISLPTAFVIGDLKCTTVSINDIDTGAPSISTDIVDTNGLGTYVLD
CRCVspikepr	----MFLILLISLPMFAVIGDLKCTTVSINDVDTGAPSISTDVVDVTNGLGTYVLD
HEVspikepro	----MFFILLITLPSVFAVIGDLKCNTSSINDVDTGVPSISSEVVDVTNGLGTFYVLD
CECVspikepr	MIVLVTCILLLCSYHTASSTSNNDQRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGTVVVG--
	: ***: . : .: .* .: : * . : : ** * .
BCVspikepro	YLNTTLLLNNGYYPTSGSTYRNMALKGTLTLLSTLWFKPPFLSDFINGIFAKVKNTKVIKNG
HCVspikepro	YLNTTLLLNNGYYPTSGSTYRNMALKGTLTLLSRLWFKPPFLSDFINGIFAKVKNTKVIKNG
CRCVspikepr	YLNTTLLLNNGYYPTSGSTYRNMALKGTLTLLSTLWFKPPFLSDFIDGVFAKVKNTKVIKNG
HEVspikepro	YLNTTLLLNNGYYPISGATFRNVALKGTRLLSTLWFKPPFLSPFNDGIFAKVKNRFSKHG
CECVspikepr	YYPTEVWYNCSRTATTTAYEYFSNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLHGVHGEVPS--V
	* * : * . : : : . : : : : : : : : : : * : .
BCVspikepro	VMYSEFPAITIGSTFVNTSYSVVVQPHTTNLDNKLOGLLEISVCQYTMCEYPHTICHPNL
HCVspikepro	VMYSEFPAITIGSTFVNTSYSVVVQPHTTNLDNKLOGLLEISVCQYTMCEYPHTICHPNL
CRCVspikepr	VVYSEFPAITIGSTFVNTSYSVVVQPHTTNLDNKLOGLLEISVCQYTMCDYPHTMCHPNL
HEVspikepro	VIYSEFPAITIGSTFVNTSYSIVVKPHTSFINGNLQGLQISVCQYTMCEYPQTICHPNL
CECVspikepr	IIYISYRDDVQHRPLLKHGLVCITESRNIDYN-SFTSSQWNSICTGNDRKIPFSVIPTDN
	: * : . . : : : . : : : . : : : . : * : . . * : : . :
BCVspikepro	GNRRIELWHWDGTGVVSCLYKRNFYDVN-----ADYLYFHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
HCVspikepro	GNRRVELWHWDGTGVVSCLYKRNFYDVN-----ADYLYFHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
CRCVspikepr	GNKRIELWHWDGTGVVPCLYKRNFYDVN-----ADYLYSHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
HEVspikepro	GNQRIELWHHDTDVVSCLYRRNFYDVN-----ADYLYFHFYQEGGTFYAYFTDTGFVT
CECVspikepr	GTKIYGLEWNEFVTAYISGRSYNWNINNNWFNNVTLLYSRSSTATWQHSAAVYQGVSN
	* . : * * * . : * . : : : * . : : : * : : * : . .
BCVspikepro	KFLFNVYLGTVLSHYVMP-----LTCNSAMTLEYWVTPLTSKQYLLAFNQDGVIF
HCVspikepro	KFLFNVYLGTVLSHYVLP-----LTCNSAMTLEYWVTPLTSKQYLLAFNQDGVIF
CRCVspikepr	KFLFHVYLGTVLSHYVMP-----LTCNSAMTLEYWVTPLTFKQYLLAFNQDGVIF
HEVspikepro	KFLFKLYLGTVLSHYVMP-----LTCDSALSLEYWVTPLTRQFLLAFDQDGVLY
CECVspikepr	FTYYKLNNNTNGLKTYELCEDYEYCTGYATNIFAPTGGYIPDGFNFNNWFLLTNSSTFVS
	: : : . * . * : . : . * : : : : * : : . .

FIGURA 10 (Página 2 de 5)

BCVspikepro	NAVDCKSDFMSEIKCKTSLIAPSTGVYELNGYTVQPIADVYRR-I PNLPDCNIEAWLNDK
HCVspikepro	NAVDCKSDFMSEIKCKTSLIAPSTGVYELNGYTVQPIADVYRR-I PNLPDCNIEAWLNDK
CRCVspikepr	NAVDCKSDFMSEIKCKTSLIAPSTGVYELNGYTVQPIADVYRR-I PNLPDCNIEAWLNDK
HEVspikepro	HAVDCASDFMSEIMCKTSSITPPTGVYELNGYTVQPVATVYRR-IPDLPNCDIEAWLNSK
CECVspikepr	GRFVTNQPLLWNCLWPVPSFGVAAQEFCEGAQFSQCNGVFLNNTVDVIRFNLNFTADVQ
	. . : : . * : . : : : * . . * : . : : : : :
BCVspikepro	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLMSFIQADSFTCN-----NIDAAKIYGMCFSSITIDK ³⁸⁸
HCVspikepro	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLMSFIQADSFTCN-----NIDAAKIYGMCFSSITIDK
CRCVspikepr	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLMSFIQADSFTCN-----NIDAAKIYGMCFSSITIDK
HEVspikepro	TVSSPLNWERKIFSNCFNFMGRMSFIQADSFQCN-----NIDASRLYGMCFGSITIDK
CECVspikepr	SGMGATVFSLNTTGGCILEISCYNDIVSESSFYSYGEIPFGVTDGPRYCYVLYNGTALKY
	: . . : : . * : : : . : : . * : . * . . : : . : : .
BCVspikepro	FAIPNGRKVDLQGLNGLYLQSFNYRIDTTATSCQLYYNLPAAN-VSVSRFNPSTWNRREFG ⁴⁰⁷
HCVspikepro	FAIPNGRKVDLQGLNGLYLQSFNYRIDTTATSCQLYYNLPAAN-VSVSRFNPSTWNRREFG
CRCVspikepr	FAIPNGRKVDLQGMNGLYLQSFNYRIDTTATSCQLYYNLPAAN-VSISRFPNSIWNRRFEG ⁴³⁶ ⁴⁴⁰ ⁴⁴⁷
HEVspikepro	FAIPNSRKVDLQVGKSGYLQSFNYKIDTAVSSCQLYYSLPAAN-VSVTHYNPSSWNRRYRG
CECVspikepr	FGTLPPSVKEIAISKWGQFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYTEALV
	* . : : : : * : . * . : : . : : * . : : : : : . : : .
BCVspikepro	FTEQSVFKPQPVGVFTDHDVVYAQHCFAKPTNFCPCKLDGSLCVGSGSGIDAGYKNSGIG ⁵⁰¹
HCVspikepro	FTEQSVFKPQPVGVFTDHDVVYAQHCFAKPTNFCPCKLDGSLCVGNGPGIDAGYKNSGIG
CRCVspikepr	FTEQSVFKPQPVGVFTDHDVVYAQHCFAKPTNFCPCKLNGSLCVGSGFGIDAGYKNSGIG
HEVspikepro	FINQS-----FGSRGLHDAVYSQQCFNTPNTYCPCRT--SQCIGG-----AGTG
CECVspikepr	QVENTAIKKVTYCNSHINNIKCSQLTANLQNGFYFPVASSEVGLVNKSVVLLPSFYSHTSV
	: : : : : : : * : . : * : : .
BCVspikepro	TCPAGTNYLTCH----NAAQCNCCLCTPDPITSKSTGPKYKCPQTKYLVGIGEHCSGLAIKS ⁵²⁵ ⁵²⁸ ⁵⁴⁰
HCVspikepro	TCPAGTNYLTCH----NAAQCDCLCTPDPITSKSTGPKYKCPQTKYLVGIGEHCSGLAIKS
CRCVspikepr	TCPAGTNYLTCH----NAAQCDCLCTPDPITSKSTGPKYKCPQTKYLVGIGEHCSGLAIKS
HEVspikepro	TCPVGTTRKCFAAVTNATKCTCWCQPDSTYKGVNAWTCQSKVSIQPGQHCPGLGLVE
CECVspikepr	NITIDLGMKRSGYG--QPIASTLSNITLPMQDNNTDVYCIRSNQFSVYVHSTCKSSLWDN
	 : . . . * : : : : : . * . . .

FIGURA 10 (Página 3 de 5)

582 608
 BCVspikepro DYCGGNPCTCQPAFLGWSVDSCLQGDRCN--IFANFILHDVNSGTTCTDLQKSNTDII
 HCVspikepro DYCGGNPCTCQPAFLGWSVDSCLQGDRCN--IFANFILHDVNSGTTCTDLQKSNTDII
 CRCVspikepr DYCGGNPCTCQPAFLGWSVDSCLQGDRCN--IFANFILHGVNSGTTCTDLQKSNTDII
 HEVspikepro DD CSGNPCTCKPQAFIGWSSETCLQNGRCN--IFANFILNDVNSGTTCTDLQOGNTNIT
 CECVspikepr NFNQDCTDVL YATAVIKTGTCPFSFDKLNNYLTFNKLCLSLNPTGANCKFDVAARTRTNE
 : * : . . . * * : * : * . * : .

BCVspikepro LGVCVNYDLYGITGQGFVEVNATYYNSWQNLLYDSNGNLYGFRDYL TNRTFMIRSCYSG
 HCVspikepro LGVCVNYDLYGITGQGFVEVNAPYYNSWQNLLYDSNGNLYGFRDYL TNRTFMIRSCYSG
 CRCVspikepr LGVCVNYDLYGITGQGFVEVNATYYNSWQNLLYDSNGNLYGFRDYL TNRTFMIRSCYSG
 HEVspikepro TDVCVNYDLYGITGQGILIEVNATYYNSWQNLLYDSSGNLYGFRDYLSNRTFLIRSCYSG
 CECVspikepr QVVRSLYVIYEEGDNIVGVPSDNLHDL SVLHLD SCTDYN--IYGR TGVGII RQTNST
 * * : * . : : : . . : . * * : * . . : * . *

692 695
 BCVspikepro RVSAAFHANSSEPALLFRNI KCNYVFNN TLSRQLQPINYFDSYLGCVVNADNSTSSAVQT
 HCVspikepro RVSAAFHANSSEPALLFRNI KCSYVFNN TLSRQLQPINYFDSYLGCVVNADNSTSSVVQT
 CRCVspikepr RVSAFHNSSEPALLFRNI KCNYVFNN TLSRQLQPINYFDSYLGCVVNADNSTSSSVQT
 HEVspikepro RVSAVFHANSSEPALMFRNLKCSHVFN YITL RQIQLVNYFDSYLGCVVNAYNNTASAVST
 CECVspikepr ILSGLHYTSLSGDLLGFKNVSDGVVYSVTPCDVSAQA AVIDGAIVGAMTSINSELLGLTH
 : * * * * : . . * : * : * . : . : * . :

757 758 763 769 786
 BCVspikepro CDLTVGSGYCVDYSTKRRSRRAIT TGYRFTNFEPFTVNS-----VNDS
 HCVspikepro CDLTVGSGYCVDYSTKRRSRRAIT TGYRFTNFEPFTVNS-----VNDS
 CRCVspikepr CDLTVGSGYWG DYSTQRRSRRTIT TGYRFTNFEPFTVNP-----VNDS
 HEVspikepro CDLTVGSGYCVDYVTALRSRRSFT TGYRFTNFEPFAANL-----VNDS
 CECVspikepr WTTTPNFYYSIYNTTNERTRGTAIDSNDVDCEPIITYSNIGVCKNGALVFINVTHSDGD
 * . * * * . * : . . . : * : . : .

792 818 827 828
 BCVspikepro LEPVGGLYEIQIPSEFTIGNMEEFIQISSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEYGSFCDN
 HCVspikepro LEPVGGLYEIQIPSEFTIGNMEEFIQTSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEYGSFCDN
 CRCVspikepr LHPVGGLYEIQIPSEFTIGNMEEFIQTRSPKVTIDCPVFVCGDYAACKSQLVEYGSFCDN
 HEVspikepro IEPVGGLYEIQIPSEFTIGNLEEFITSSPKVTIDCATFVCGDYAACRQQLAEYGSFCEN
 CECVspikepr VQPIS-TGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTT PVSIDCSRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQT
 : * : . : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

FIGURA 10 (Página 4 de 5)

[illegible]

FIGURA 10 (Pagina 5 de 5)

BCVspikepro	ECVKSQSSRINFCGNGNHIIISLVQNAPYGLYFIHFSYVPTKYVTAKVSPGLCIAGDRGIA
HCVspikepro	ECVKSQSSRINFCGNGNHIIISLVQNAPYGLYFIHFSYVPTKYVTAKVSPGLCIAGDRGIA
CRCVspikepr	ECVKSQSSRINFCGNGNHIIISLVQNAPYGLYFIHFSYVPTKYVTAKVSPGLCIAGDRGIA
HEVspikepro	ECVKSQSSRINFCGNGNHIIISLVQNAPYGLYFIHFSYVPTKYVTAKVSPGLCIAGDIGIS
CECVspikepr	ECVRSQSRFGFCGNGTHLFLSLANAAAPNGMVFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGDRTF
	:.+:.*****.+:**.: ** *: *: * : ** * *.. .*: * :..
BCVspikepro	-----PKSGYFVNVTNMTGSGYYYPEPITGNNVVMSTCAVNYTKAPDVMLNISTP
HCVspikepro	-----PKSGYFVNVTNMTGSGYYYPEPITGNNVVMSTCAVNYTKAPDVMLNISTP
CRCVspikepr	-----PKSGYFVNVTNMTGSGYYYPEPITGNNVVMSTCAVNYTKAPDVMLNISTP
HEVspikepro	-----PKSGYFINVNSWMTGSGYYYPEPITQNNVVMSTCAVNYTKAPDLMLNTSTP
CECVspikepr	GLVVKDVQLTLFRNLDDKFYLTPTMYQPRAATSSDFVQIEGCDVLFVNATVIDLPSIIP
	: * *::: : * * *.. * :.* :. * * :.* : * *
	1256 1257
BCVspikepro	NLPDFKEELDQWFKNQTS--VAPDLSLDYINVTFLDLQDEMNI-----RLQE
HCVspikepro	NLHDFKEELDQWFKNQTS--VAPDLSLDYINVTFLDLQDEMNI-----RLQE
CRCVspikepr	NLPDFKEELDQWFKNQTL--MAPDLSLDYINVTFLDLQDEMNI-----RLQE
HEVspikepro	NLPDFKEELYQWFKNQSS--LAPDLSFDYINVTFLDLQDEMNI-----RLQE
CECVspikepr	DYIDINQTVQDILENYRPNWTVPELTIDIFNATYLNLTGEIDOLEFRSEKLNNTTVELAI
	: *::: : : : * .*: * : *.*: * * .*: *
BCVspikepro	AIKVLNQSINLKDIGTYEYVVKWPWYVWLLIGLAGVAMLVLLFFICCTGCGTSCFKKC
HCVspikepro	AIKVLNQSINLKDIGTYEYVVKWPWYVWLLIGFAGVAMLVLLFFICCTGCGTSCFKIC
CRCVspikepr	AIKVLNHSYINLKDIGTYEYVVKWPWYVWLLIGLAGVAMLVLLFFICCTGCGTSCFKKC
HEVspikepro	AIKVLNHSYINLKDIGTYEYVVKWPWYVWLLICLAGVAMLVLLFFICCTGCGTSCFKKC
CECVspikepr	LIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVFCIPILLFCCSTGCCG-CIGCL
	. :: :*: :. * ***** :. * : ** * **.* * *
BCVspikepro	GGCCDDYTGHQELVIKTSHDD-----
HCVspikepro	GGCCDDYTGHQELVIKTSHDD-----
CRCVspikepr	GGCCDDYTGHQELVIKTSHDD-----
HEVspikepro	GGCFDDYTGHQEFVIKTSHDD-----
CECVspikepr	GSCCHSICSRQFENYEPIEKVHVH-----
	. .. :::: . :.

FIGURA 11

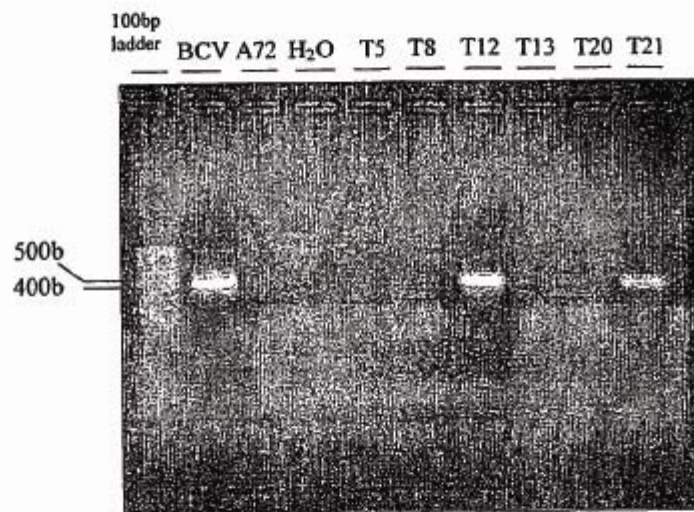


FIGURA 12

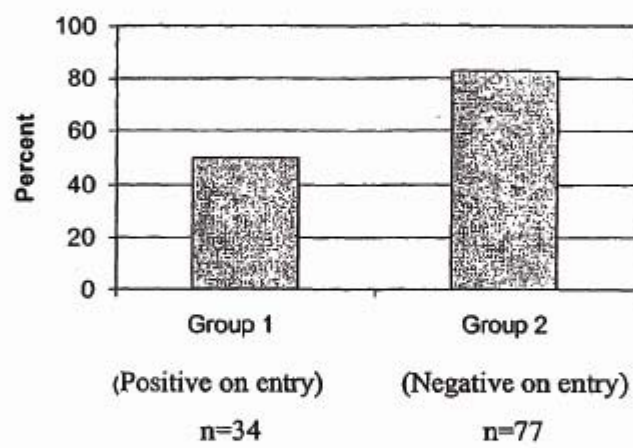


FIGURA 13

```

TATCGCAGCC TTACTTTTGT TAATGTACCA TATGTTTATA ATGGCTCTGC ACAATCTACA 60
GCTCTTTGTA AATCTGGTAG TTTAGTTCTT AATAACCCCTG CATATATAGC TCGTGAAGCT 120
AATTTTGGGG ATTATTATTA TAAGGTTGAA GCTGATTCTT ATTGTCAGG TTGTGACGAG 180
TATATCGTAC CACTTTGTAT TTTTAACGGC AAGTTTTTGT CGAATACAAA GTATTATGAT 240
GATAGTCAAT ATTATTTTAA TAAAGACACT GGTGTTATTT ATGGTTTCAA TTCTACTGAA 300
ACCATTAACA CTGGTTTGA TTTTAATTGT CATTATTAC TTTTACCCTC TGGTAATTAT 360
TTAGCCATTT CAAATGAGCT ATTGTTAACT GTTCCTACGA AAGCAATCTG TCTTAATAAG 420
CGTAAGGATT TTACGCCTGT ACAGGTTGTT GACTCGCGGT GGAACAATGC CAGGCAGTCT 480
GATAACATGA CGGCGG 497

```

FIGURA 14

```

YRSLTFVNVP YVYNGSAQST ALCKSGSLVL NNPAYIAREA NFGDYYYKVE ADFYLSGCDE 60
YIVPLCIFNG KELSNTKYD DSQYYFNKDT GVIYGFNSTE TINTGFDFNC HYLLLPSGNY 120
LAISNELLLT VPTKAICLNK RKDFTEPVQV DSRWNNARQS DNMTA 165

```

FIGURA 15 (Pagina 1 de 2)

```

CRCV  TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGTACCATATGTTTATAATGGCTCTGCACAATCTACA
BCV   TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGTACCATATGTTTATAATGGCTCTGCACAATCTACA
OC43  TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGTACCATATGTTTATAATGGCTCTGCACAATCTACA
HECV  TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGTACCATATGTTTACAATGGCTCTGCACAATCTACA
HEV   TATCGCAGTCTTACTTTAGTTAATGTGCCATACGTTTACAATGGGTCAGCTCAACCCACC
*****

CRCV  GCTCTTTGTAAATCTGGTAGTTTAGTTCCTTAATAACCCCTGCATATATAGCTCGTGAAGCT
BCV   GCTCTTTGTAAATCTGGTAGTTTAGTTCCTTAATAACCCCTGCATATATAGCTCGTGAAGCT
OC43  GCTCTTTGTAAATCTGGTAGTTTAGTCCTTAATAACCCCTGCATATATAGCTCCTCAAGCT
HECV  GCTCTTTGTAAATCTGGTAGTTTAGTTCCTTAATAACCCCTGCATATATAGCTCGTGAAGCT
HEV   GCACCTTTGTAGTCTGGCAGTTTAATTCTTAACAATCCTGCATATATAGCCCGTGAGGCT
*****

CRCV  AATTTTGGGGATTATTATTATAAGGTTGAAGCTGATTTCATTTGTCAGGTTGTGACGAG
BCV   AATTTTGGGGATTATTATTATAAGGTTGAAGCTGATTTCATTTGTCAGGTTGTGACGAG
OC43  AACTCTGGGGATTATTATTATAAGGTTGAAGCTGATTTCATTTGTCAGGTTGTGACGAG
HECV  AATTTTGGGGATTATTATTATAAGGTTGAAGCTGATTTCATTTGTCAGGTTGTGACGAG
HEV   AATGTGGGTGATTATTATTATAAGTCTGAAGCAGATTTTCTCTCTCAGGTTGTGACGAG
*****

CRCV  TATATCGTACCACCTTTGTATTTTAAACGGCAAGTTTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
BCV   TATATCGTACCACCTTTGTATTTTAAACGGCAAGTTTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
OC43  TATATCGTACCACCTTTGTATTTTAAACGGCAAGTTTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
HECV  TATATCGTACCACCTTTGTATTTTAAACGGCAAGTTTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
HEV   TATATCGTACCACCTTTGTATTTTAAATGGCAAGTTTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
*****

CRCV  GATAGTCAATATTATTTTAAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTTTCAATTCTACTGAA
BCV   GATAGTCAATATTATTTTAAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTCTCAATTCTACTGAA
OC43  GATAGTCAATATTATTTTAAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTCTCAATTCTACTGAA
HECV  GATAGTCAATATTATTTTAAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTCTCAATTCTACTGAA
HEV   GATAGTCAATATTATTTTAAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTCTCAATTCTACTGAA
*****

CRCV  ACCATTAACTACTGGTTTGTATTTAATTGTCATTATTTACTTTTACCCTCTGGTAATTAT
BCV   ACCATTAACTACTGGTTTGTATTTAATTGTCATTATTTAGTTTACCCTCTGGTAATTAT
OC43  ACCATTAACTACTGGTTTGTATTTAATTGTTTATTATTTAGTTTACCCTCTGGTAATTAT
HECV  ACCATTAACTACTGGTTTGTATTTAATTGTCATTATTTAGTTCTACCCTCTGGCAATTAT
HEV   ACCATTAACTACTGGTTTGTATTTAATTGTCATTATTTAGTTCTACCCTCTGGTAATTAT
*****

CRCV  TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTAACTGTTCTACGAAAGCAATCTGTCTTAATAAG
BCV   TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTAACTGTTCTACGAAAGCAATCTGTCTTAATAAG
OC43  TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTAACTGTTCTACGAAAGCAATCTGTCTTAATAAG
HECV  TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTAACTGTTCTACTAAAGCAATCTGTCTTAATAAG
HEV   CTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTAACTGTTCTACTAAAGCAATCTGTCTTAATAAG
*****

```


(Pagina 2 de 2)

```

CRCV  CGTAAGGATTTACGCCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGGCAGTCT
BCV   CGTAAGGATTTACGCCTGTACAGGTTGTTGACTCTCGGTGGAACAATGCCAGGCAGTCT
OC43  CGTAAGGATTTACGCCTGTACAGGTTGTTGATTGCGCGGTGGAACAATGCCAGGCAGTCT
HECV  CGTAAGGATTTACGCCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGGCAGTCT
HEV   CGTAAGGTTTTTACGCCTGTACAGGTTGTTGATTGCGCGGTGGAACAATGCCAGGCAATCT
      ***** **

CRCV  GATAACATGACGGCGGT
BCV   GATAACATGACGGCGGT
OC43  GATAACATGACGGCGGT
HECV  GATAACATGACGGCAGT
HEV   GATAACATGACGGCAGT
      ***** **

```

FIGURA 16

```

CRCV  YRSLTFVNVVPYVYNGSAQSTALCKSGSLVLNNPAYIAREANFGDYYYKVEADFYLSGCDE
BCV   YRSLTFVNVVPYVYNGSAQSTALCKSGSLVLNNPAYIAREANFGDYYYKVEADFYLSGCDE
OC43  YRSLTFVNVVPYVYNGSAQSTALCKSGSLVLNNPAYIAPQANSBGDYYYKVEADFYLSGCDE
HECV  YRSLTFVNVVPYVYNGSAQSTALCKSGSLVLNNPAYIAREANFGDYYYKVEADFYLSGCDE
HEV   YRSLTLVNVVPYVYNGSAQPTALCKSGSLVLNNPAYIAREANVGDYYYKSEADFSLSGCDE
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

CRCV  YIVPLCIFNGKFLSNTRYDDSQYYFNKDTGVIYGFNSTETINTGFDNFCHYLLVPSGNY
BCV   YIVPLCIFNGKFLSNTRYDDSQYYFNKDTGVIYGLNSTETITTTGFDNFCHYLVLPNGNY
OC43  YIVPLCIFNGKFLSNTRYDDSQYYFNKDTGVIYGLNSTETITTTGFDLNCYLVLPNGNY
HECV  YIVPLCIFNGKFLSNTRYDDSQYYFNKDTGVIYGLNSTETITTTGFDNFCHYLVLPNGNY
HEV   YIVPLCIFNGKFLSNTRYDDSQYYFNKDTGVIYGLNSTETITTTGFDNFCHYLVLPNGNY
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

CRCV  LAISNELLLTVPTKAICLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
BCV   LAISNELLLTVPTKAICLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
OC43  LAISNELLLTVPTKAICLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
HECV  LAISNELLLTVPTKAICLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
HEV   LAISNELLLTVPTKAICLNKRKVFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
      *****

```

FIGURA 17

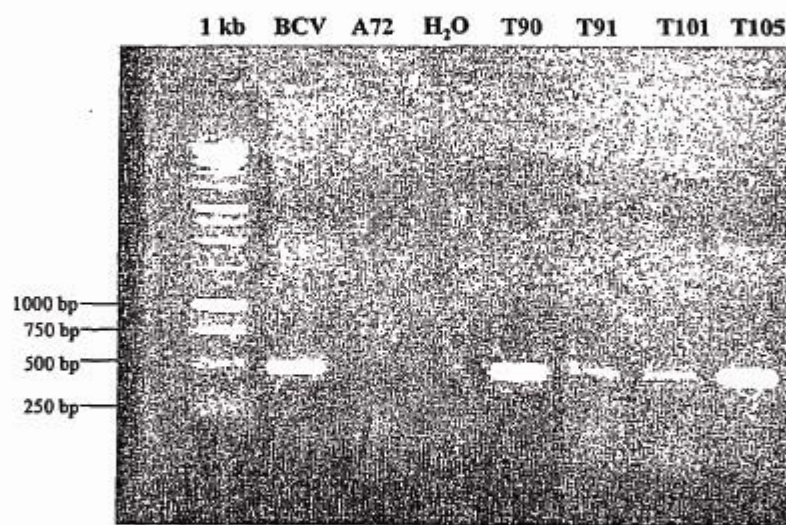
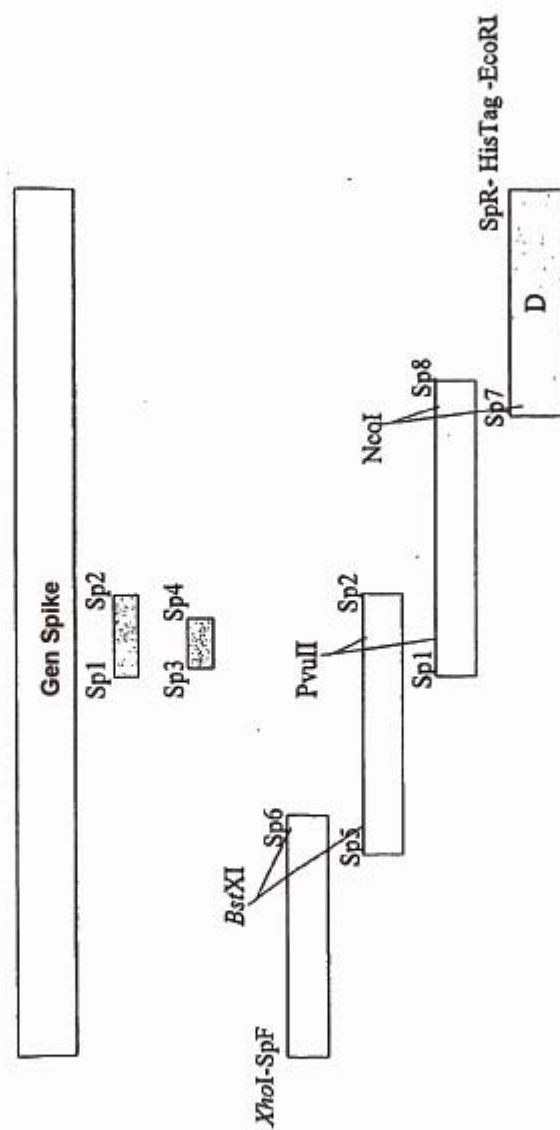


FIGURA 18



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6057436 A [0012]
- US 6372224 A, Miller [0012]
- WO 9816643 A [0140]

Literatura no de patente citada en la descripción

- Coronaviridae. **Cavanagh et al.** Virus Taxonomy, 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wein, 407-411 [0013]
- **Pearson WR.** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63-98 [0020]
- **Sambrook et al.** Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0106]
- **Lu et al.** *J. Org. Chem.*, 1981, vol. 46, 3433 [0107]
- **Saiki et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0125]
- **Compton.** *Nature*, 1991, vol. 350, 91-92 [0131]
- *AIDS*, 1993, vol. 7 (2), S108 [0131]
- **Walker et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1992, vol. 20, 1691-1696 [0131]
- **Balaguer et al.** Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent. *Anal. Biochem.*, 1991, vol. 195, 105-110 [0133]
- **Dilesare et al.** A high-sensitivity electrochemiluminescence- based detection system for automated PCR product quantitation. *BioTechniques*, 1993, vol. 15, 152-157 [0133]
- **Saiki et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0145]
- **Cohen et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, 2110 [0148]
- **Sambrook et al.** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0148]
- **Sherman et al.** Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 1986 [0148]
- **Beggs.** *Nature*, 1978, vol. 275, 104-109 [0148]
- **Luchansky et al.** *Mol. Microbiol.*, 1988, vol. 2, 637-646 [0150]
- **Becker ; Guarente.** *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 194, 182 [0151]
- **Southern.** *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503 [0155]
- **Berent et al.** *Biotech.*, 1985, vol. 3, 208 [0155]
- Canine infectious tracheobronchitis, Short review: tos de perrera. **Appel, M. ; Binn L.N.** Virus infections of carnivores. Elsevier Science Publishers, 1987, 201-211 [0249]
- **Bemis, D.A. ; Carmichael, L.E. ; Appel, M.J.** Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by Bordetella bronchiseptica. *Cornell Vet.*, 1977, vol. 67, 282-93 [0249]
- **Binn, L.N. ; Alford, J. P. ; Marchwicki, R. H. ; Keefe, T.J. ; Beattie, R. J. ; Wall, H.G.** Studies of respiratory disease in random-source laboratory dogs: viral infections in unconditioned dogs. *Lab Anim Sci.*, 1979, vol. 29, 48-52 [0249]
- **Binn, L. N. ; Eddy, G. A. ; Lazar, E. C. ; Helms, J. ; Murnane, T.** Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1967, vol. 126, 140-5 [0249]
- **Chilvers, M. A. ; McKean, M. ; Rutman, A. ; Myint, B. S. ; Silverman, M. ; O'Callaghan, C.** The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J.*, 2001, vol. 18, 965-70 [0249]
- **Ditchfield, J. ; Macpherson, L. W. ; Zbitnew, A.** Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("kennel, cough"). *Can. Vet. Jour.*, 1962, vol. 3, 238-247 [0249]
- **Felsenstein, J.** PHYLP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2c). *Cladistics*, 1989, vol. 5, 164-166 [0249]
- **Ignjatovic, J. ; Sapats, S.** Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech.*, 2000, vol. 19, 493-508 [0249]
- **Karpas, A. ; King, N.W. ; Garcia, F.G. ; Calvo, F. ; Cross, R.E.** Canine tracheobronchitis: Isolation and characterization of the agent with experimental reproduction of the disease. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 1968, vol. 127, 45-52 [0249]
- **Keil, D.J. ; Fenwick, B.** Role of Bordetella bronchiseptica in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, 1998, vol. 15, 200-7 [0249]
- **Lou, T.Y. ; Wenner, H.A.** Natural and experimental infection of dogs with reovirus, type1: pathogenicity of the strain for other animals. *Am.J.Hyg.*, 1963, vol. 77, 293-304 [0249]
- **Makela, M.J. ; Puhakka ,T. ; Ruuskanen, O. ; Leinonen, M. ; Saikku, P. ; Kimpimaki, M. ; Blomqvist, S. ; Hyypia, T. ; Arstila, P.** Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.*, 1998, vol. 36, 539-42 [0249]
- **Page, R.D.M.** Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, vol. 12, 357-358 [0249]
- **Pearson WR.** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63-98 [0249]

- **Pensaert M ; Callebaut P ; Vergote J.** Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q.*, July 1986, vol. 8 (3), 257-61 [0249]
- 5 • **Randolph JF ; Moise NS ; Scarlett JM ; Shin SJ ; Blue JT ; Bookbinder PR.** Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *Am J Vet Res.*, March 1993, vol. 54 (3), 387-91 [0249]
- **Spaan W ; Cavanagh D ; Horzinek MC.** Coronavirus: structure and genome expression. *J Gen Virol.*, December 1988, vol. 69, 2939-52 [0249]
- 10 • **Stephensen CB ; Casebolt DB ; Gangopadhyay NN.** Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronavirus and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.*, April 1999, vol. 60 (2), 181-9 [0249]
- **Storz J ; Purdy CW ; Lin X ; Burrell M ; Truax RE ; Briggs RE ; Frank GH ; Loan RW.** Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotidal viruses, and *Pasteurella* spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med Assoc.*, 15 May 2000, vol. 216 (10), 1599-604 [0249]
- 15 • **Tennant BJ ; Gaskell RM ; Jones RC ; Gaskell CJ.** Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet Rec.*, 02 January 1993, vol. 132 (1), 7-11 [0249]
- **Thompson JD ; Gibson TJ ; Plewniak F ; Jeanmougin F ; Higgins DG.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 15 December 1997, vol. 25 (24), 4876-82 [0249]